

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 4 月 3 日 (03.04.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/027290 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/29, C12Q 1/68 江井 祐弘 (HIEI, Yuko) [JP/JP]; 〒438-0802 静岡県 磐田郡 豊田町 東原 7 0 0 番地 日本たばこ産業株式会社 植物イノベーションセンター内 Shizuoka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/09429
- (22) 国際出願日: 2002 年 9 月 13 日 (13.09.2002) (74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区 大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2 0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-285247 2001 年 9 月 19 日 (19.09.2001) JP
特願2001-309135 2001 年 10 月 4 日 (04.10.2001) JP
特願2002-185709 2002 年 6 月 26 日 (26.06.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP]; 〒105-8422 東京都港区 虎ノ門 2 丁目 2 番 1 号 Tokyo (JP). シンジェンタ リミテッド (SYNGENTA LIMITED) [GB/GB]; GU27 3JE サリーヘーゼルミア ファーンハースト Surrey (GB).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小森 俊之 (KOMORI, Toshiyuki) [JP/JP]; 〒438-0802 静岡県 磐田郡 豊田町 東原 7 0 0 番地 日本たばこ産業株式会社 植物イノベーションセンター内 Shizuoka (JP). 太田 象三 (OTA, Shozo) [JP/JP]; 〒227-8512 神奈川県 横浜市 青葉区 梅が丘 6-2 日本たばこ産業株式会社 たばこ事業本部内 Kanagawa (JP). 村井 宣彦 (MURAI, Nobuhiko) [JP/JP]; 〒105-8422 東京都港区 虎ノ門 2 丁目 2 番 1 号 日本たばこ産業株式会社 関連事業室内 Tokyo (JP). 樋
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF IMPARTING OR CONTROLLING FERTILITY WITH THE USE OF FERTILITY RESTORING GENE FOR RICE BT-MALE STERILITY CYTOPLASM AND METHOD OF JUDGING THE EXISTENCE OF FERTILITY RESTORING GENE

(54) 発明の名称: イネ BT 型雄性不稔細胞質に対する稔性回復遺伝子を利用した、稔性の付与若しくは抑制方法、及び稔性回復遺伝子の存在の識別方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of imparting or controlling fertility to rice BT-male sterility cytoplasm and a method of judging the existence of a fertility restoring gene. In these methods, use is made of a nucleic acid having the base sequence represented by SEQ ID NO:27 or a nucleic acid having a base sequence showing at least a 70% identity with the base sequence represented by SEQ ID NO:27 and having a function of restoring fertility. Alternatively, use is made of a nucleic acid having the base sequence consisting of the bases at the 38538- to 54123-positions in the base sequence represented by SEQ ID NO:27 or a nucleic acid having a base sequence showing at least a 70% identity with the base sequence consisting of the bases at the 38538- to 54123-positions in the base sequence represented by SEQ ID NO:27 and having a function of restoring fertility.

[続葉有]



(57) 要約:

本発明は、イネBT型雄性不稔細胞質に対する、稔性の付与若しくは抑制方法、及び稔性回復遺伝子の存在の識別方法を提供することを目的とする。本発明は、配列番号27の塩基配列を有する核酸、又は配列番号27の塩基配列と少なくとも70%同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸を利用するものである。あるいは、配列番号27の塩基38538-54123の塩基配列を有する核酸、又は配列番号27の塩基38538-54123の塩基配列と少なくとも70%同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸を利用する。

明細書

イネ B T 型雄性不稔細胞質に対する稔性回復遺伝子を利用した、稔性の付与若しくは抑制方法、及び稔性回復遺伝子の存在の識別方法

5 技術分野

本発明は、イネ B T 型雄性不稔細胞質に対する稔性回復遺伝子を利用した、稔性の付与若しくは抑制方法、及び稔性回復遺伝子の存在の識別方法に関する。

本出願は、2001年9月19日に提出された日本特許出願 特願2001-285247号、2001年10月4日に提出された日本特許出願 特願2001-309135号及び2002年6月26日に提出された日本特許出願 特願2002-185709号を基礎とする優先権主張出願である。当該3つの日本特許出願の内容は全て本明細書に援用される。

背景技術

15 イネは自殖性植物であるため、品種間で交雑を行う場合には、まず自家受精を避けるためにイネの穎花が開花する直前に穎花内の雄しべを全て取り除き、次いで交雑をする花粉親品種由来の花粉を用いて受精させる必要がある。しかしながら、このような手作業による交雑方法で商業的規模での大量の雑種種子を生産することは不可能である。

20 そこで、ハイブリッドライスの生産には、細胞質雄性不稔を利用する三系法が利用されている。三系法とは、雄性不稔細胞質を保有する系統である不稔系統、Rf-1 遺伝子を保有する系統である回復系統、および核遺伝子は不稔系統と同一であって不稔細胞質を保有しない系統である維持系統とを使用する方法をいう。これらの3系統を用いて、(i) 不稔系統に回復系統の花粉を受精させることによりハイブリッド種子を獲得することができ、(ii) 一方、不稔系統に維持系統の花粉を受精させることにより不稔系統を維持することができる。

25 三系法で B T 型雄性不稔細胞質を利用するにあたっては、回復系統のイネを育成するために、育種における各過程で育成中のイネが Rf-1 遺伝子を保有すること、また、最終段階では Rf-1 遺伝子をホモで保有することを確認する必要

がある。また、三系法において、回復系統に使用する品種が確実に R f - 1 遺伝子を保有することを調べたり、得られたハイブリッド種子が稔性を回復しているか確認するために、R f - 1 遺伝子の存在を調べる必要が生じる場合もある。

従来、植物体中での R f - 1 遺伝子座の遺伝子型を推定するためには、まず、
5 検定系統と交配を行った交配種子から植物体 (F 1) を形成し、次いで F 1 植物を自殖させてその種子の形成率が一定以上 (例えば 70 ~ 80 % 以上) である個体の出現頻度を調査する必要があった。なお、検定系統とは、維持系統、不稔系統あるいは両系統のセットを指し、目的とする被検定個体の細胞質が B T 型か通常細胞質か、あるいは不明かにより適宜選択するものである。不稔系統を検定系
10 統として用いる場合は母親として、維持系統を検定系統として用いる場合は父親として、それぞれ被検定個体に交配する。

しかしながら、これらの方法を行うには、莫大な労力と時間を要する。また、種子稔性は、環境要因の影響を受けやすいので、低温・日照不足などの不良環境で調査すれば、遺伝子型の構成によらず不稔になる場合があり、R f - 1 遺伝子
15 座の遺伝子型推定が正確に行えないという問題を有していた。

このような問題を解消するために、最近では、分子生物学的方法により R f - 1 遺伝子の存在を判別する方法も提案されている。それは、R f - 1 遺伝子と連鎖する塩基配列 (以下、DNA マーカーという) を検出することにより、R f - 1 遺伝子の存在または不存在を調べる方法である。因みに、R f - 1 遺伝子の DNA 配列は未解読であるため、直接 R f - 1 遺伝子を検出することは、現在の技術では不可能であった。

例えば、イネの R f - 1 遺伝子座は第 10 染色体上に存在し、そして、制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析に使用することができる DNA マーカー (RFLP マーカー) 座 G 2 9 1 と G 1 2 7 との間であることが報告されている (Fuk
25 u t a e t a l. 1 9 9 2, J p n J. B r e e d. 4 2 (s u p l. 1) 1 6 4 - 1 6 5)。このため、R f - 1 遺伝子と連鎖する DNA マーカー座 G 2 9 1 および G 1 2 7 の遺伝子型を調査することにより、R f - 1 遺伝子座の遺伝子型を推定することが可能である。

しかしながら、従来の分子生物学的方法にはいくつかの問題が存在する。第一の問題は、従来の方法では、使用するマーカーがRFLPマーカーであり、これ
を検出するためにはサザンブロット解析を行う必要があるという点である。サザ
ンブロット解析を行うためには、被検定個体から数マイクログラム単位の精製さ
れたDNAを必要とし、さらに制限酵素処理、電気泳動、ブロッティング、プロ
5 ヲーブとのハイブリダイゼーション、およびシグナルの検出からなる一連の作業手
順を行う必要があるため、多大な労力が必要であるうえに、検定結果を得るまで
に1週間程度かかっていた。

第二の問題は、RFLPマーカー座G291とG127の間の遺伝子地図距離
10 は約30cM（イネDNAでは約9000kbpに相当する）と長いため、二重
組換えが起こる可能性が数%程度はありと考えられ、Rf-1遺伝子座の遺伝子
型が必ずしも正確に推定できないことである。

さらに第三の問題は、Rf-1遺伝子の存在をRFLPマーカー座G291お
よびG127の遺伝子型を調査することにより推定する場合、選抜の結果育成さ
15 れる稔性回復系統には、Rf-1遺伝子と共に、RFLPマーカー座G291と
G127の間の遺伝子領域も導入されるという点である。その結果、導入DNA
配列は30cM以上のRf-1遺伝子ドナー親由来の染色体領域を有することにな
り、導入DNA領域中に存在する可能性がある劣悪遺伝子をRf-1遺伝子と
同時に導入してしまう危険性があった。

20 このような問題を解決するため、Rf-1遺伝子座と連鎖する優性DNAマ
ーカー（特開平7-222588）および共優性DNAマーカー（特開平9-31
3187）が開発されている。これらのマーカーは、Rf-1遺伝子座とそれぞ
れ、 1.6 ± 0.7 cM（イネDNAでは約480kbpに相当）および 3.7 ± 1.1 cM（イネDNAでは約1110kbpに相当）の遺伝的距離で連鎖し
25 ており、両座はRf-1遺伝子座を挟む位置関係にある。そのため、優性PCR
マーカー座および共優性PCRマーカー座は、これらが両方とも存在すること
を検出することにより、Rf-1遺伝子の存在を推定することができる。また、共
優性PCRマーカーの使用は、Rf-1遺伝子座の遺伝子型がホモかヘテロかも
推定することを可能にする。

- しかしながら、これらのPCRマーカーを使用する場合にも、依然としていくつかの問題がある。この共優性マーカーはRf-1遺伝子座と3.7±1.1cMの遺伝距離を有するため、Rf-1遺伝子座との間での組換え頻度が高いという問題が十分には解決されていない。その結果、共優性マーカー自体については
- 5 ホモ型またはヘテロ型まで正確に検出することができるが、共優性マーカー座とRf-1遺伝子座との間で組換えが生じる場合に、Rf-1遺伝子座の遺伝子型の推定、特にホモ型またはヘテロ型までの推定を正確に実施できないという問題がある。一方、優性マーカーを使用してRf-1遺伝子座の遺伝子型を推定する場合、優性マーカーではRf-1遺伝子がホモの個体(Rf-1/Rf-1)およびヘテロの個体(Rf-1/rf-1)の両方を区別することなく検出してしま
- 10 う。そのため、上記共優性マーカーと優性マーカーとを組み合わせを利用してRf-1遺伝子座の遺伝子型を推定したとしても、Rf-1遺伝子に関するホモ型とヘテロ型とを正確に識別することはできない。また、優性マーカーを用いて行うPCRでは、PCR産物が得られなかった場合には、実験操作上の問題に起因する可能性も否定できない。さらに、これらの共優性マーカーと優性マーカーとの間の遺伝的距離が約5.3cM(約1590kbp)と離れているため、Rf-1遺伝子ドナー親からの導入染色体領域長を短い長さに限定することができないので、この領域中に含まれる劣悪遺伝子の持ち込みを抑制できないという問題点も有している。
- 15 さらに、特開2000-139465には、イネ第10染色体のRf-1遺伝子の近傍に座乗するRFLPマーカーの塩基配列に基づいて開発された、共優性PCRマーカーが記載されている。しかしながら、それらのPCRマーカーは、依然としてRf-1遺伝子からの遺伝的距離が約1cMより離れているという問題を有している。

25

発明の開示

本発明は、イネの稔性を回復する方法を提供することを目的とする。本発明の方法は、配列番号27の塩基配列を有する核酸、又は配列番号27の塩基配列と少なくとも70%同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸をイネに

導入する、ことを含む。本発明の方法は、また、配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8
 - 5 4 1 2 3 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5
 4 1 2 3 の塩基配列と少なくとも 70 % 同一の塩基配列であって、稔性回復機能
 を有する核酸をイネに導入する、ことを含む。本発明の方法は、さらに、配列番
 5 号 27 の塩基 4 2 3 5 7 - 5 3 7 4 3、より好ましくは塩基 4 2 1 3 2 - 4 8 8
 8 3 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 4 2 3 5 7 - 5 3 7 4
 3、より好ましくは塩基 4 2 1 3 2 - 4 8 8 8 3 の塩基配列と少なくとも 70 %
 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸をイネに導入する、ことを
 含む。 本発明の方法は、一態様において、好ましくは、配列番号 27 の塩基配
 10 列又は配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3 の塩基配列と、少なくとも 7
 0 % 同一の塩基配列は、以下の条件 1) 及び 2) の少なくとも一つを満たす：

- 1) 配列番号 27 の塩基 4 5 4 6 1 に相当する塩基が A である；及び
- 2) 配列番号 27 の塩基 4 9 6 0 9 に相当する塩基が A である。

本発明はまた、被検定イネ個体又は種子が R f - 1 遺伝子を有するか否かを識
 15 別する方法を提供することを目的とする。本発明の識別方法は、稔性回復遺伝子
 (R f - 1 遺伝子) の機能の有無を決定する配列がイネ第 10 染色体上の多型検
 出用マーカー座 P 4 4 9 7 M b o I と B 5 6 6 9 1 X b a I の間に存在する
 ことを利用する。

本発明の方法は、一態様において、好ましくは、配列番号 27 の塩基配列と又
 20 は配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3 の塩基配列と、少なくとも 70 %
 同一の塩基配列が、以下の条件 1) 及び 2) の少なくとも一つを満たす場合に被
 検定イネ個体又は種子が R f - 1 遺伝子を有すると判断する：

- 1) 配列番号 27 の塩基 4 5 4 6 1 に相当する塩基が A である；及び
- 2) 配列番号 27 の塩基 4 9 6 0 9 に相当する塩基が A である。

25 本発明は、さらに、R f - 1 遺伝子の稔性回復機能を抑制する方法を提供する
 ことを目的とする。本発明の抑制方法は、一態様において、配列番号 27 の塩基
 配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基配列と少なくとも 70 % 同一の塩基
 配列であって、稔性回復機能を有する核酸に、対し相補的な塩基配列から選択さ
 れる、連続した少なくとも 100 塩基の長さのアンチセンスを導入する、ことを

含む。本発明の抑制方法は、また、一態様において、配列番号 27 の塩基 38538-54123 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 38538-54123 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸、に対し相補的な塩基配列から選択される、連続した少なくとも 100 塩基の長さのアンチセンスを導入する、ことを含む。

本発明はさらにまた、配列番号 27 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸を提供することを目的とする。本発明はまた、配列番号 27 の塩基 38538-54123 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 38538-54123 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸を提供する。本発明の方法は、さらに、配列番号 27 の塩基 42357-53743、より好ましくは塩基 42132-48883 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 42357-53743、より好ましくは塩基 42132-48883 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸を提供する。

図面の簡単な説明

図 1 は、RFLP マーカー座 S12564 を起点とする染色体歩行の結果を示す。

図 2 は、BAC クローン AC068923 とラムダクローンコンティグとの位置関係を示す。

図 3 は、Rf-1 座極近傍組換え型花粉（いずれも稔性あり）の Rf-1 座極近傍の染色体構成を、その花粉から生じた 10 個体（RS1、RS2、RC1-8）のマーカー座の遺伝子型に基づき、明らかにした結果を示したものである。

白抜き部分はジャポニカ型領域を、黒部分はインディカ型領域を示す。

図 4 は、第 10 染色体上のマーカー座と Rf-1 座との連鎖分析の結果に基づき、Rf-1 座の連鎖地図上での位置を示したものである。地図距離は、1042 F1 個体の分離データから算出した。

図5は、相補性試験によるRf-1領域の同定のために使用した、10個のゲノムクローン由来の断片を示す。染色体歩行により得られたλクローン（細い線）を用いて、太い直線で示した染色体領域について相補性試験を行った。XS F 1 8は、欠失を含むクローンであることが分かったので、その欠失部分は点線で示した。

図6は、XSG 1 6由来の15.7 kb（実施例10）及びXS F 1 8由来の16.2 kb断片（実施例8）を用いた相補性試験の結果を示す。XSG 1 6由来の15.7 kbでは稔性が回復し、稲穂がたれている。

10 発明を実施するための最良の形態

本発明者らは、まず、Rf-1の存在部位を第10染色体上の極めて狭い範囲に特定した。その結果に基づいて、Rf-1遺伝子座の近傍に存在するPCRマーカーを開発し、これらのPCRマーカーが、Rf-1遺伝子座と連鎖することを利用して、Rf-1遺伝子を検出する方法が見出された。具体的には、Rf-1 15 遺伝子座が、イネ第10染色体上に存在するPCRマーカー座S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I座とC 1 3 6 1 M w o I座との間に座乗することを利用して、近傍に存在する新規のPCRマーカー座の遺伝子型を調査することにより、Rf-1遺伝子の有無の調査およびRf-1遺伝子ホモ型個体の選抜を実施する。当該Rf-1遺伝子を検出する方法につき、本発明者らは、平成12年8月 20 17日に特願2000-247204として特許出願を行っている。当該出願の全内容は参考文献として本明細書に援用される。

I. 特願2000-247204に記載のRf-1遺伝子座の遺伝子型を推定する方法

特願2000-247204は、Rf-1遺伝子座がイネ第10染色体上のR 25 FLPマーカー座S 1 2 5 6 4座とC 1 3 6 1座との間に座乗することを利用して、被検定イネ個体または種子がRf-1遺伝子を持つか否かを識別する方法について記載している。

マーカー

R f - 1 遺伝子座の近傍に存在する特定の領域に対して設計したプライマー対を用いて P C R を行い、その産物を特定の制限酵素で処理後電気泳動にかけると、ジャポニカ系統とインディカ系統との間で、異なる大きさのバンドが観察されることがある。そのような場合、インディカ系統に特徴的なバンドを R f - 1 連鎖バンドとする。本発明者らにより、R f - 1 遺伝子座は、イネ第 10 染色体上に存在する P C R マーカー座 S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座と C 1 3 6 1 M w o I 座との間に座乗することが明らかにされ、その周辺での P C R マーカーは当業者が適宜開発して使用可能となった。

例えば、下記の群から選択される P C R マーカーの少なくとも 1 個を被検体イネのゲノム中に存在するか否かを検出することにより、被検定個体がこれらの P C R マーカーと連鎖する R f - 1 遺伝子を持つか否かを識別する：

(1) マーカー 1： 配列番号 1 および配列番号 2 の配列を有する DNA をプライマーとして用いてゲノミック P C R を行い、得られた産物中の、制限酵素 E c o R I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、P C R マーカー R 1 8 7 7 E c o R I；

(2) マーカー 2： 配列番号 3 および配列番号 4 の配列を有する DNA をプライマーとして用いてゲノミック P C R を行い、得られた産物中の、制限酵素 H i n d I I I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、P C R マーカー G 4 0 0 3 H i n d I I I (配列番号 19)；

(3) マーカー 3： 配列番号 5 および配列番号 6 の配列を有する DNA をプライマーとして用いてゲノミック P C R を行い、得られた産物中の、制限酵素 M w o I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、P C R マーカー C 1 3 6 1 M w o I (配列番号 20)；

(4) マーカー 4： 配列番号 7 および配列番号 8 の配列を有する DNA をプライマーとして用いてゲノミック P C R を行い、得られた産物中の、制限酵素 M w o I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの

間の多型を検出する、PCRマーカーG 2 1 5 5 M w o I (配列番号 2 1) ;

(5) マーカー5 : 配列番号9および配列番号10の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素M s p I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーG 2 9 1 M s p I (配列番号 2 2) ;

(6) マーカー6 : 配列番号11および配列番号12の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素B s l I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーR 2 3 0 3 B s l I (配列番号 2 3) ;

(7) マーカー7 : 配列番号13および配列番号14の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素B s t U I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーS 1 0 0 1 9 B s t U I (配列番号 2 4) ;

(8) マーカー8 : 配列番号15および配列番号16の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素K p n I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーS 1 0 6 0 2 K p n I (配列番号 2 5) ; および

(9) マーカー9 : 配列番号17および配列番号18の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素T s p 5 0 9 I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーS 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I (配列番号 2 6) 。

なお、上記PCRマーカーは、R f - 1 遺伝子座が、イネ第10染色体上の9個のRFLPマーカー領域R 1 8 7 7、G 2 9 1、R 2 3 0 3、S 1 2 5 6 4、

C1361、S10019、G4003、S10602、およびG2155付近に座乗する可能性が高いと考え (Fukuta et al. 1992, Jpn J. Breed. 42 (supl. 1) 164-165 によるRFLP連鎖解析結果、およびHarushima et al. 1998, Genetics 148 479-494によるイネRFLP連鎖地図を参照)、これらのRFLPマーカ-を、後記参考例1に記載するようにして、共優性PCRマーカ-であるCAPSマーカ-またはdCAPSマーカ- (Michaels and Amasino 1998, The Plant Journal 14 (3) 381-385; Neff et al. 1998, The plant Journal 14 (3) 387-392) に変換した。この変換により、上記PCRマーカ-が得られた。

これらのPCRマーカ-のうち、PCRマーカ-R1877 EcoRI、G291 MspI (配列番号22)、R2303 BslI (配列番号23) およびS12564 Tsp509I (配列番号26) からなる群と、PCRマーカ-C1361 MwoI (配列番号20)、S10019 BstUI (配列番号24)、G4003 HindIII (配列番号19)、S10602 KpnI (配列番号25)、およびG2155 MwoI (配列番号21) からなる群とは、第10染色体上でRf-1遺伝子座を挟んで反対側に存在する。

従って、一態様において、(a) PCRマーカ-R1877 EcoRI、G291 MspI、R2303 BslIおよびS12564 Tsp509Iからなる群から選択される少なくとも1個のPCRマーカ-、並びに(b) PCRマーカ-C1361 MwoI、S10019 BstUI、G4003 HindIII、S10602 KpnI、およびG2155 MwoIからなる群から選択される少なくとも1個のPCRマーカ-によりRf-1連鎖バンドを検出することにより、Rf-1遺伝子の存在を検出する。その際、上記(a)の群からRf-1遺伝子に最も近いマーカ-として、少なくともPCRマーカ-S12564 Tsp509Iおよび上記(b)の群から少なくともC1361 MwoIを使用することが好ましい。被検定イネのゲノム中に、

(a) のPCRマーカーによるRf-1連鎖バンドと(b)のPCRマーカーによるRf-1連鎖バンドの両方が検出されれば、そのイネがRf-1遺伝子を有する可能性を高い確率で推定することができる。

- 別の態様においては、上記(a)の群から少なくとも二つのPCRマーカー、
 5 及び(b)の群から少なくとも二つのPCRマーカーによりRf-1連鎖バンドを検出する。例えば、(a)及び(b)の群のマーカーのうち、図1に示す遺伝子地図において、Rf-1遺伝子により近いマーカーによりRf-1連鎖バンドが検出され、それよりRf-1遺伝子から遠いマーカーによりRf-1連鎖バンドが検出されないイネ個体を選抜することにより、Rf-1遺伝子を有するが、
 10 不要な遺伝子領域をできるだけ含まないイネを選抜することが可能である。この場合も、(a)及び(b)の各群のマーカーのうち少なくとも一つは、それぞれPCRマーカーS12564 Tsp509IおよびC1361 MwoIであることが好ましい。すなわち、2種のPCRマーカー座S12564 Tsp509IとC1361 MwoIは、マーカー座間距離にして0.3cM離れている。この性質を利用することにより、Rf-1遺伝子ドナー親から導入する染色体領域を1cM程度に狭めることができる。その結果、ドナー親のRf-1遺伝子近傍に存在する可能性がある劣悪遺伝子が回復系統に導入される可能性を最小限に抑えることができる。

Rf-1遺伝子の検出

- 20 被検定イネゲノム中のRf-1遺伝子を検出するには、上記配列番号1-18のプライマーを用いて、被検定イネゲノムから上記PCRマーカーのいずれかをPCRで増幅させ、ポリメラーゼ連鎖反応-制限酵素断片長多型(PCR-RFLP)法で検出する。PCR-RFLP法は、比較する品種系統間において、PCRにより増幅したDNA断片配列中の制限酵素認識部位に多型が存在する場合
 25 に、その制限酵素による切断パターンからいずれの型であるかを簡便に決定する方法である(D. E. Harry, et al., Theor Appl Genet (1998) 97:327-336)。

制限酵素による切断パターンとしては、可視化されたゲル上に、使用したプライマー対に応じて、以下の表1のようなバンドの存在の有無が確認される。

表 1

| 5 | 検出されるバンドの おおよそのサイズ (b p) |
|----|---|
| 10 | プライマー対 1 によるマーカー 1 の検出 (R1877 EcoRI) 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 1500及び1700 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 1500、1700及び3200 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 3200 |
| 15 | プライマー対 2 によるマーカー 2 の検出 (G4003 HindIII) 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 362 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 95、267及び362 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 95及び267 |
| 20 | プライマー対 3 によるマーカー 3 の検出 (C1361 MwoI) 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 50及び107 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 25、50、79及び107 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 25、50及び79 |
| 25 | プライマー対 4 によるマーカー 4 の検出 (G2155 MwoI) 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 25、27及び78 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 25、27、78及び105 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 25及び105 |
| | プライマー対 5 によるマーカー 5 の検出 (G291 MspI) 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 25、49及び55 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 25、49、55及び104 |

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 25及び104

プライマー対6によるマーカー6の検出 (R2303 BslI)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 238、655及び679

5 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 238、655、679
及び1334

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 238及び1334

プライマー対7によるマーカー7の検出 (S10019 BstUI)

10 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 130、218及び244

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 130、218、244
及び462

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 130及び462

15 プライマー対8によるマーカー8の検出 (S10602 KpnI)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 724

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 117、607及び724

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 117及び607

20 プライマー対9によるマーカー9の検出 (S12564 Tsp509I)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 41及び117

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 26、41、91及び117

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 26、41及び91

25

I I. R f - 1 遺伝子座領域の特定

以上、特願2000-247204において、Rf-1遺伝子座がDNAマーカー座S12564 Tsp509IとC1361 MwoI座との間に座乗することが本発明者らにより明らかにされ、これを利用したRFLP-PCR用マ

一カーが記載されている。R f - 1 遺伝子を持たない通常のジャポニカ品種に、
戻し交雑により R f - 1 遺伝子を導入することにより回復系統が育成される。そ
の過程で、特願 2 0 0 0 - 2 4 7 2 0 4 に記載の R f - 1 遺伝子座の識別方法を
用いると、回復系統の育成が効率的（必要期間は 2 ～ 3 年）になるだけでなく、
5 導入断片長を制御することができる。

しかしながら、交雑による導入では、R f - 1 極近傍領域をも同時に導入する
ことは避けられない。特願 2 0 0 0 - 2 4 7 2 0 4 において、R f - 1 遺伝子座
が DNA マーカー座 S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I と C 1 3 6 1 M w o I 座と
の間に座乗することが解明されたが、両遺伝子座は約 0. 3 c M、即ち約 9 0 k
10 b p である。仮に R f - 1 極近傍に劣悪遺伝子が存在すれば、R f - 1 遺伝子と
もにその劣悪遺伝子も導入される可能性が否定できない。

そこで、本発明者らは DNA マーカー座 S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I と C 1
3 6 1 M w o I 座の間の領域について、R f - 1 遺伝子座と DNA マーカー座
S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I とが密接連鎖することを手がかりに、染色体歩行
15 および遺伝学的解析を行うことにより、R f - 1 遺伝子と連鎖する領域を調べ
た。その結果、R f - 1 遺伝子を含む R f - 1 遺伝子座領域を約 7 6 k b まで特
定し、そして当該領域の全塩基配列を決定することに成功した。本発明により、
B T 型雄性不稔細胞質に対する稔性回復遺伝子の機能を遺伝子工学的に導入する
ことが可能となった。

20 具体的には、特願 2 0 0 0 - 2 4 7 2 0 4 では、MS コシヒカリに MS - F R
コシヒカリ（R f - 1 座ヘテロ）の花粉をかけて作成した集団 1 0 4 2 個体を用
いて連鎖分析を行い、R f - 1 座と S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座との間での
組換え個体を 1 個体、R f - 1 座と C 1 3 6 1 M w o I 座との間での組換え個
体を 2 個体見出した（本明細書中の参考例 1 - 2）。本発明では、上記集団をさ
25 らに 4 1 0 3 個体追加し、合計 5 1 4 5 個体として解析を行った。その結果、新
たに、R f - 1 座と S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座との間での組換え個体を 1
個体、R f - 1 座と C 1 3 6 1 M w o I 座との間での組換え個体を 6 個体見
出し、それぞれの組換え個体の合計を 2 個体および 8 個体とした。これら 1 0 個体

を R f - 1 座極近傍組換え個体として、本発明の高精度分離分析に供試することとした（実施例 1）。

R f - 1 座と S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座との間での組換え個体が 2 個体に対し、C 1 3 6 1 M w o I 座との間での組換え個体が 8 個体という上記の組
5 換え個体出現頻度は、S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座と C 1 3 6 1 M w o I 座とを比較すると、S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座のほうが遺伝学的に R f - 1 座に近いことを意味する。遺伝的距離（組換え価 c M が単位）と物理的距離（塩基対数 b p が単位）とは必ずしも比例しないが、通常は遺伝的距離が短ければ物理的距離も短いと期待できる。

10 そこで、S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座を起点に染色体歩行を行うことにより、R f - 1 座を単離することとした（実施例 2）。染色体歩行には、インディカ品種 I R 2 4 およびジャポニカ品種あそみのりのゲノム DNA を用いて λ D A S H I I

15 ベクターにより作成したゲノミックライブラリーを供試した。I R 2 4 は R f - 1 保有品種、あそみのりは R f - 1 非保有品種である。染色体歩行を進めた結果、I R 2 4 のゲノミッククローンにより約 7 6 k b の染色体領域をカバーするコンティグ（複数のクローンを重複部分で重ね合わせて染色上での順に整列化したもの）を作成することができ、その全塩基配列（7 6 3 6 3 b p）を決定した。

次いで、得られた塩基配列情報等を利用することにより、新たに 1 2 個のマ
20 ーカーを開発し、既述の R f - 1 座極近傍組換え個体 1 0 個体を用いて、高精度分離分析を行った（実施例 3）。その結果、上記の約 7 6 k b の染色体領域に含まれる 6 5 k b の配列が R f - 1 遺伝子の機能の有無を決定する配列を包含することが示された。この領域は、8 個のゲノミッククローンから構成されるコンティグによりカバーされている。各クローンの長さは、約 1 2 ~ 2 2 k b であり少なくとも 4 . 7 k b の重複部を持つ。一方、イネの遺伝子の長さについては、短い
25 ものから長いものまでであることが知られているが、大部分の遺伝子は数 k b 以内であると考えられる。そのため、これら 8 個のゲノミッククローンのうち、少なくともひとつは完全長の R f - 1 遺伝子を包含すると予測される。

本発明者らはさらに、上記 76 kb の染色体領域のうち、Rf-1 遺伝子領域をさらに絞り込むと共に、稔性回復能の存在を直接的に証明するために、相補性試験を行った。

具体的には、雄性不稔系統である MS コシヒカリの未熟種子に、上記 76 kb 領域内の 10 個の部分断片（各 10～21 kb）を、別々に遺伝子工学的に導入した（図 5）。使用された 10 個の部分断片のうち、8 個は先に染色体歩行で得られた 8 個のゲノミッククローン（図 1、実施例 3 に記載の XSE1、XSE7、XSF4、XSF20、XSG22、XSG16、XSG8 及び XSH18）に由来するものである。これらに加えて、さらに 2 個のクローン XSF18 および XSX1 に由来する断片についても相補性試験を行った。XSF18 は XSF20 と 5' 末端及び 3' 末端（各々、配列番号 27 の塩基 20328 及び 41921）が同一だが、途中の塩基 33947-38591 を欠いている。これは、最初にクローン XSF18 が単離されたが、単離後の増殖の過程で上記欠失を生じたことが判明したため、再度増殖をやり直すことにより、完全型のクローンを単離し、XSF20 と命名したことに因る（実施例 8）。また、XSX1 は、クローン XSG8 と XSH18 の重複部分がやや小さいため（約 7 kb）、制限酵素処理およびライゲーションにより両クローンから、重複部分を十分に含むようなクローンを新たに作成したものである（実施例 13）。

Rf-1 は優性遺伝子であるので、導入した断片が Rf-1 遺伝子を完全に包含している場合には、形質転換植物当代において稔性が回復する。相補性試験において、各断片について形質転換植物の種子稔性調査を行い、λファージクローン XSG16 に由来する 15.6 kb 断片（配列番号 27 の塩基 38538-54123 を含む）を導入した形質転換体において、種子稔性が回復していることが見出された（実施例 10）。他の断片については、形質転換植物はすべて不稔であった。これらの結果から、上記 15.6 kb 断片が Rf-1 遺伝子を完全に包含していることが示された。さらに、本発明により、Rf-1 遺伝子を遺伝子工学的に導入する方法が提供され、その有効性が実証された。

本発明者は、λファージクローン XSG16 のどの部分が Rf-1 遺伝子を含むかをさらに特定するために、前述の 15.6 kb 断片（配列番号 27 の塩基 3

8 5 3 8 - 5 4 1 2 3を含む) よりも短い断片について相補性試験による種子稔性調査を行った。その結果、X S G 1 6に由来する1 1 . 4 k b断片(配列番号2 7の塩基4 2 3 5 7 - 5 3 7 4 3を含む)を導入した形質転換体において、種子稔性が回復していることが見出された(実施例1 0 (2))。さらに、より短い6 . 8 k b断片(配列番号2 7の塩基4 2 1 3 2 - 4 8 8 8 3を含む)を導入した形質転換体においても、種子稔性が回復した(実施例1 0 (3))。これらの結果から、上記6 . 8 k b断片がR f - 1遺伝子を包含していることが示された。

I I I . R f - 1 遺伝子座を含む核酸

- 10 本発明は、稔性回復遺伝子(R f - 1)座を含む核酸を提供する。本発明の稔性回復遺伝子(R f - 1)座を含む核酸は、配列番号2 7の塩基配列を有する核酸、又は配列番号2 7の塩基配列と少なくとも7 0 %同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸を含む。

- さらに、実施例1 0に記載したように、配列番号2 7の塩基配列のうち、特に塩基3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3にR f - 1遺伝子が完全に含まれていると確認された。よって、本発明は特に、配列番号2 7の塩基3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3の塩基配列を有する核酸、又は配列番号2 7の塩基3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3の塩基配列と少なくとも7 0 %同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸を提供する。以下、本明細書中、文脈により「配列番号2 7の塩基配列」という用語は、配列番号2 7全体、あるいは、その一部であって稔性回復機能に關与する部分、特に、塩基3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3を示す。より好ましくは、塩基4 2 3 5 7 - 5 3 7 4 3、さらに好ましくは、塩基4 2 1 3 2 - 4 8 8 8 3を示す。

- 後述する実施例では、稔性回復遺伝子(R f - 1)を含む核酸として、R f - 1遺伝子を含むインディカ米のI R 2 4のゲノムライブラリーより核酸が単離され、配列番号2 7の塩基配列が決定された。しかしながら、本発明の、稔性回復遺伝子(R f - 1)を含む核酸の由来は、R f - 1遺伝子を有するインディカ型品種由来のものであれば特に限定されない。R f - 1遺伝子を有するインディカ型品種は、特に限定されず、例えば、I R 2 4、I R 8、I R 3 6、I R 6 4、Chinsurah、Boro I Iが含まれる。R f - 1遺伝子を有しないジャ

ポニカ型品種としては、例えば、限定されるわけではないが、あそみのり、コシ
ヒカリ、きらら397、アキヒカリ、あきたこまち、ササニシキ、キヌヒカリ、
日本晴、初星、黄金晴、ヒノヒカリ、ミネアサヒ、あいちのかおり、ハツシモ、
アケボノ、フジヒカリ、峰の雪もち、ココノエモチ、ふくひびき、どんとこい、
5 五百万石、ハナエチゼン、トドロキワセ、はえぬき、どまんなか、ヤマヒカリ等
が知られている。「インディカ型品種」も「ジャポニカ型品種」も当業者に周知
であり、当業者はどのようなイネ品種が本発明の対象となり得るか容易に判断で
きる。

本発明の核酸は、一本鎖および二本鎖型両方のDNAと共に、そのRNA相補
10 体も含む。DNAには、例えば、ゲノムDNA（その対応するcDNAも含
む）、化学的に合成されたDNA、PCRにより増幅されたDNA、およびそれ
らの組み合わせが含まれる。

本発明のRf-1遺伝子を含む核酸は、好ましくは配列番号27の塩基配列を
有する。1つ以上のコドンが同一のアミノ酸をコードする場合があります、遺伝暗号
15 の縮重と呼ばれている。このため、配列番号27と完全には一致していないDN
A配列が、配列番号27と全く同一のアミノ酸配列を有するタンパク質をコード
することがあり得る。こうした変異体DNA配列は、サイレント（silent）突然変異（例えば、PCR増幅中に発生する）から生じてよいし、または
天然配列の意図的な突然変異誘発の産物であってもよい。

20 また、同一の機能を有するタンパク質であっても、由来する品種の相違によっ
て、そのアミノ酸配列に相違が存在しうることは当業者にとって周知の事実であ
る。本発明のRf-1遺伝子は、稔性回復機能を有する限り、配列番号27の塩
基配列のこのような相同体、変異体も含みうる。「稔性回復機能を有する」と
は、当該DNA断片が導入された場合に、イネ個体又は種子に稔性を付与するこ
25 とを意味する。稔性回復は、Rf-1遺伝子よりタンパク質が発現されることに
因ってもよく、あるいはRf-1遺伝子の核酸（DNA又はRNA）自体が稔性
の付与に何らかの機能をしていてもよい。

限定されるわけではないが、Rf-1遺伝子の相同体、変異体が稔性回復機能
を有するか否かは、例えば、以下のように調べることが可能である。MSコシヒ

カリ（不稔系統）にコシヒカリの花粉をかけることにより得た未熟種子を供試して、Hiei et al (Plant Journal (1994), 6 (2), p. 272-282)の方法に従い、被検定核酸断片を導入する。得られた形質転換体を通常の条件で栽培すると、被検定核酸断片が稔性回復機能を有する場合にのみ、種子が稔る。

Rf-1遺伝子を有しないジャポニカ型のあそみのりの対応する領域に由来する核酸は、配列番号28に示した塩基配列を有する。配列番号28と配列番号27の対応する部分は、全体として約98%の同一性を有する。よって、本発明の稔性回復遺伝子（Rf-1）座を含む核酸は、配列番号27と少なくとも約70%、好ましくは約80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の同一性を有する。

同一性パーセントは、視覚的検査および数学的計算により決定してもよい。あるいは、2つの核酸配列の同一性パーセントは、Devereuxら, Nucleic Acids Res., 12:387 (1984)に記載され、そしてウィスコンシン大学遺伝学コンピューターグループ（UWGCG）より入手可能なGAPコンピュータープログラム、バージョン6.0を用い配列情報を比較することにより、決定してもよい。GAPプログラムの好ましいデフォルトパラメーターには：（1）ヌクレオチドに関する単一（unary）比較マトリックス（同一に対し1および非同一に対し0の値を含む）、およびSchwartzおよびDayhoff監修, Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)に記載されるような、GribnikovおよびBurgess, Nucleic Acids Res. 14:6745 (1986)の加重比較マトリックス；（2）各ギャップに対する3.0のペナルティおよび各ギャップ中の各記号に対しさらに0.10のペナルティ；および（3）末端ギャップに対するペナルティなし、が含まれる。当業者に用いられる、配列比較の他のプログラムもまた、用いてもよい。

本発明の核酸はまた、配列番号27の塩基配列に中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることが可能であり、かつ、稔性回復機能を有する核酸、並びに、配列番号27の塩基配列に高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることが可能であり、かつ、稔性回復機能を有する核酸を含む。

- 5 本明細書において使用されるように、中程度にストリンジェントな条件は、例えば、DNAの長さに基づき、一般の技術を有する当業者により、容易に決定することが可能である。基本的な条件は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Vol. 1, pp. 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)に示されている。
- 10 例えば、ニトロセルロースフィルターに関し、5XSSC、0.5%SDS、1.0mM EDTA (pH8.0)の前洗浄溶液、約40℃ないし60℃での、1XSSCないし6XSSC（または約42℃での約50%ホルムアミド中の、例えばスターク溶液（Stark's solution）などの他の同様のハイブリダイゼーション溶液）のハイブリダイゼーション条件、および約6
- 15 0℃、0.5XSSC、0.1% SDSの洗浄条件の使用が含まれる。また、例えば、ハイブリダイゼーション溶液が約50%ホルムアミドを含む場合、上記ハイブリダイゼーション温度は約15℃ないし20℃低めとなる。非常にストリンジェントな条件もまた、例えばDNAの長さに基づき、当業者により、容易に
- 20 決定することが可能である。一般に、非常にストリンジェントな条件は、上記中程度にストリンジェントな条件よりも、より高い温度及び／又はより低い塩濃度でのハイブリダイゼーション、及び／又は洗浄条件を含む、例えば、約60℃ないし65℃での0.1XSSCないし0.2XSSCのハイブリダイゼーション条件、および／又は約65℃ないし68℃、0.2XSSC、0.1% SDS
- 25 の洗浄条件を含む。当業者は温度および洗浄溶液塩濃度は、プローブの長さなどの要因にしたがい、必要に応じ調整してもよいことを認識するであろう。

同様に、本発明のDNAには、1つまたは複数の塩基の欠失、挿入または置換のため、配列番号27の塩基配列とは異なるが稔性回復機能を有する核酸を含む。稔性回復機能を有する限り、欠失、挿入または置換される塩基の数は特に制

限されないが、好ましくは1個ないし数千個、より好ましくは1個ないし千個、さらにこのましくは1個ないし500個、さらにより好ましくは1個ないし200個、最も好ましくは1個ないし100個である。

本明細書の記載に基づいてRf-1遺伝子がより特定されたならば、当業者が
5 Rf-1遺伝子以外の部分またはRf-1遺伝子内のイントロン部分などの核酸を除いて使用することが可能である。また、既定のアミノ酸を、例えば同様の物理化学的特性を有する残基により置換してもよい。こうした保存的置換の例には、1つの脂肪族残基を互いに、例えばIle、Val、Leu、またはAlaを互いに置換するもの；LysおよびArg、GluおよびAsp、またはGln
10 nおよびAsn間といった、1つの極性残基から別のものへの置換；あるいは芳香族残基の別のものでの置換、例えばPhe、Trp、またはTyrを互いに置換するものが含まれる。他の保存的置換、例えば、同様の疎水性特性を有する領域全体の置換が、周知である。当業者は、周知の遺伝子工学的手法により、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)等に記載の、例えば部位特異的突然変異誘発法を使用して、所望の欠失、挿入または置換を施すことが可能である。

本発明者らは、Rf-1遺伝子を有するインディカ型のIR24（塩基配列2
20 7）と、有しないジャポニカ型のあそみのり（塩基配列28）およびGenBankに登録されている日本晴BACクローン（アクセッション番号AC068923）とを比較した。その結果、Rf-1遺伝子を含むインディカ型のRf-1領域は少なくとも、以下の1塩基多型（SNP）を有することを見出した。

- 1) 配列番号27の塩基1239に相当する塩基がAである；
- 25 2) 配列番号27の塩基6227に相当する塩基がAである；
- 3) 配列番号27の塩基20680に相当する塩基がGである；
- 4) 配列番号27の塩基45461に相当する塩基がAである；
- 5) 配列番号27の塩基49609に相当する塩基がAである；
- 6) 配列番号27の塩基56368に相当する塩基がTである；

7) 配列番号 27 の塩基 57629 に相当する塩基が C である ; 及び

8) 配列番号 27 の塩基 66267 に相当する塩基が G である。

よって、本発明の Rf-1 領域を含む核酸は、好ましくは上記条件 1) - 8) の 1 つないし全てを満たす。

5 なお、後述の実施例 3 において、Rf-1 遺伝子極近傍組換え個体 (RS1 - RS2、RC1 - RC8) についてその Rf-1 領域の染色体構成を調べた。その結果、配列番号 27 の塩基 1239 ないし 66267 の塩基配列、即ち、最大限に見積もっても P4497 Mb o I 座から B56691 Xba I 座までの領域 (約 65 kb) (図 3) に、Rf-1 遺伝子の機能の有無を決定する配列が
10 含まれることが明らかにされた。ただし、Rf-1 遺伝子の一部の遺伝子型がインディカ型であることが、Rf-1 遺伝子の遺伝子機能発現に重要であり、残りの部分はジャポニカ型でもインディカ型でも遺伝子機能に大きな差異を生じない可能性がある。極端な場合、ジャポニカ・インディカ間でコーディング領域は完全に同一で、プロモーター領域だけに差違があり、そして、プロモーター領域及
15 びコーディング領域の一部のみが上記 P4497 Mb o I 座から B56691 Xba I 座までの領域 (約 65 kb) に含まれることもあり得る。よって、上記共有インディカ型領域 (配列番号 27 の塩基 1239 ないし 66267) が Rf-1 遺伝子全体を完全に包含するとは、断定できない。しかしながら、以下の理由、

20 1) 遺伝子の大きさは通常数 kb であり 10 kb を超えることは稀である ;
2) 本発明で明らかにした IR24 のゲノム塩基配列 (配列番号 27) は、上記共有インディカ型領域を完全に包含する ;

3) 配列番号 27 の 5' 末端は、上記共有インディカ型領域の 5' 末端から 1238 bp 上流に位置し、別の遺伝子 (S12564) の一部である ; および

25 4) 配列番号 27 の 3' 末端は、上記共有インディカ型領域の 3' 末端から 10096 bp 下流に位置する

により、少なくとも配列番号 27 は Rf-1 遺伝子全体を完全に包含すると考えられる。

このように、本発明者らは、まずRf-1遺伝子領域を76kbまで絞り込むことに成功した。よって、本発明のRf-1遺伝子領域を含む核酸は、従来技術の特開2000-139465に記載のRf-1遺伝子からの遺伝子距離が約1cM(約300kb)ある共優性マーカー座を用いて選抜した場合よりも、Rf-1遺伝子の近傍に存在する他の遺伝子を含む可能性が格段に低い。さらに、本発明者らの先の特願2000-247204に記載のDNAマーカー座S12564 Tsp509IとC1361 MwoI座(両遺伝子座の距離は約0.3cM)を用いて選抜した場合よりも他の遺伝子を含む可能性が低い。

さらに、本発明者らは相補性試験を行うことにより、配列番号27の塩基配列のうち、特に塩基38538-54123にRf-1遺伝子が完全に含まれていることを確認した。よって、本発明の一態様において、配列番号27の塩基配列又は配列番号27の塩基38538-54123の塩基配列と、少なくとも70%同一の塩基配列は、以下の条件1)及び2)の少なくとも一つを満たす：

1) 配列番号27の塩基45461に相当する塩基がAである；及び

2) 配列番号27の塩基49609に相当する塩基がAである。

IV. イネの稔性の回復方法

本発明は、配列番号27の塩基配列を有する核酸、又は配列番号27の塩基配列と少なくとも70%同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸をイネに導入することにより、イネの稔性を回復する方法を提供する。本発明の方法はまた、配列番号27の一部、特に、配列番号27の塩基38538-54123、好ましくは、塩基42357-53743、より好ましくは、塩基42132-48883の塩基配列を有する核酸、又は配列番号27の塩基38538-54123、好ましくは、塩基42357-53743、より好ましくは、塩基42132-48883の塩基配列と少なくとも70%同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸をイネに導入してもよい。

本発明において、イネに導入されうる稔性回復遺伝子(Rf-1)座を含む核酸は、先の「III. Rf-1遺伝子座を含む核酸」において記載の核酸を使用する。核酸のイネへの導入方法は特に限定されず、公知の方法を使用することが可能である。本発明の核酸は公知の遺伝子工学的な方法によって導入しても、

あるいは交配によっても導入してもよい。隣接する他の遺伝子の導入を防げる、育種年限を短縮できる、という観点より遺伝子工学的な方法の使用が好ましい。

遺伝子工学的手法による形質導入のためにはいかなる適切な発現系を使用してもよい。組換え発現ベクターは、適切な転写または翻訳制御ヌクレオチド配列、
5 例えば、哺乳動物、微生物、ウイルス、または昆虫遺伝子由来のものなどに、機能可能であるように連結されている、本発明のイネに導入されうる稔性回復遺伝子 (Rf-1) を含む核酸を含む。

制御配列の例には、転写プロモーター、オペレーター、またはエンハンサー、mRNAリボソーム結合部位、並びに転写および翻訳開始および終結を調節する
10 適切な配列が含まれる。ヌクレオチド配列は、制御配列が該DNA配列に機能的に関連しているとき、機能可能であるように連結されている。したがって、プロモーターヌクレオチド配列は、該プロモーターヌクレオチド配列がDNA配列の転写を調節するならば、DNA配列に、機能可能であるように連結されている。
イネにおいて複製する能力を与える複製起点、および形質転換体を同定する選択
15 遺伝子が、一般的に発現ベクターに取り込まれている。選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシンもしくはネオマイシン、ハイグロマイシンまたはスペクチノマイシン等の抗生物質耐性遺伝子などが例示される。

さらに、必要に応じて適切なシグナルペプチド (天然または異種性) をコード
20 する配列を、発現ベクターに取り込んでもよい。シグナルペプチド (分泌リーダー) のDNA配列を、インフレームで本発明の核酸配列に融合させ、DNAがまず転写され、そしてmRNAがシグナルペプチドを含む融合タンパク質に翻訳されるようにしてもよい

本発明によればまた、本発明の遺伝子を含む組換えベクターが提供される。プ
25 ラズミドなどのベクターに本発明の遺伝子のDNA断片を組み込む方法としては、例えば、Sambrook, J. ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1.53 (1989) に記載の方法などが挙げられる。簡便には、市販のライゲーションキッ

ト（例えば、宝酒造製等）を用いることもできる。このようにして得られる組換えベクター（例えば、組換えプラスミド）は、宿主細胞であるイネに導入される。

ベクターは、簡便には当業界において入手可能な組換え用ベクター（例えば、
5 プラスミドDNAなど）に所望の遺伝子を常法により連結することによって調製
することができる。本願発明の核酸断片を用いてイネに稔性を付与する場合に
は、特に、植物形質転換用ベクターが有用である。植物用ベクターとしては、植
物細胞中で当該遺伝子を発現し、当該タンパク質を生産する能力を有するもので
あれば特に限定されないが、例えば、pBI221、pBI121（以上C1o
10 ntech社製）、及びこれらから派生したベクターが挙げられる。また、特に
単子葉植物たるイネの形質転換には、pIG121Hm、pTOK233（以上
Hieiら、Plant J., 6, 271-282 (1994)）、pS
B424（Komariら、Plant J., 10, 165-174 (1
996)）などが例示される。

15 形質転換植物は、上述のベクターの β -グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子の
部位に本願発明の核酸断片を入れ替えて植物形質転換用ベクターを構築し、これ
を植物に導入することで調整することができる。植物形質転換用ベクターは、少
なくともプロモーター、翻訳開始コドン、所望の遺伝子（本願発明の核酸配列ま
たはその一部）、翻訳終始コドンおよびターミネーターを含んでいることが好ま
20 しい。また、シグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、所望の
遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、選抜マーカー領域などを適宜含んで
いてもよい。プロモーター、ターミネーターは植物細胞で機能するものであれば
特に限定されないが、構成的発現をするプロモーターとしては、上記ベクターに
予め組み込まれている35Sプロモーターの他に、アクチン、ユビキチン遺伝子
25 のプロモーターなどが例示される。

プラスミドを宿主細胞に導入する方法としては、一般に、Sambrook,
J. ら, Molecular Cloning, A Laboratory
Manual (2nd edition), Cold Spring Harb
or Laboratory, 1.74 (1989) に記載のリン酸カルシウム

法または塩化カルシウム／塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEGなどの化学的な処理による方法、遺伝子銃などを用いる方法などが挙げられる。植物細胞の場合は、例えばリーフディスク法 [Science, 227, 129 (1985)]、エレクトロポレーション法
5 [Nature, 319, 791 (1986)] によって形質転換することができる。

特に植物への遺伝子導入法としては、アグロバクテリウムを用いる方法 (Horsch et al., Science, 227, 129 (1985)、Hiei et al., Plant J., 6, 271-282 (1994))、エレクトロポレーション法 (Fromm et al., Nature, 319, 791 (1986))、PEG法 (Paszkowski et al., EMBO J., 3, 2717 (1984))、マイクロインジェクション法 (Crossway et al., Mol. Gen. Genet., 202, 179 (1986))、微小物衝突法 (McCabe et al., Bio/Technology, 6, 923 (1988)) など
10 が挙げられる。所望の植物に核酸を導入する方法であれば特に限定されない。

一方、交配による導入の場合には、例えば、以下のようにして行うことが可能である。まず、Rf-1 供与親とジャポニカ品種とを交雑して得られたF₁に、ジャポニカ品種を戻し交雑する。得られた個体のなかから、S12564 Tsp509 I 座がジャポニカ型ホモ、P4497 Mbo I 座及びB53627 Bst Z17 I 座がヘテロの個体を選別し、さらなる戻し交雑に供試する。得られた個体のなかから、P4497 Mbo I 座及びB56691 Xba I 座がヘテロ、B53627 Bst Z17 I 座がジャポニカ型ホモの個体を選別し、さらなる戻し交雑に供試する。以後は、戻し交雑各世代で、P4497 Mbo I 座及びB56691 Xba I 座がヘテロの個体を選別し、次の戻し交雑に供試する、という工程を10回程度繰り返す。最後に、P4497 Mbo I 座及びB56691 Xba I 座がヘテロの個体を自殖させ、得られた個体から両座がインディカ型ホモの個体を選別することにより、P4497 Mbo I 座から
20
25

B 5 6 6 9 1 X b a I 座までの限定された染色体領域を R f - 1 供与親から引き継ぐ回復系統を得ることができる。

本発明において、稔性回復遺伝子 (R f - 1) を含む核酸が単離されたことにより、R f - 1 遺伝子を遺伝子工学の技術を用いてイネ品種に導入し、回復系統を育成することが可能となった。本発明では R f - 1 領域を 7 6 k b 以下にまで絞込み込むことに成功した。よって本発明の R f - 1 遺伝子座を含む核酸は、従来技術と比較して、R f - 1 遺伝子の近傍に存在する他の遺伝子を含む可能性が格段に低い。さらに、本発明は R f - 1 遺伝子を含む領域の全塩基配列を明らかにした。当業者は、本明細書の記載に基づき R f - 1 遺伝子自体の解析を進めることができる。よって、隣接する遺伝子を全く含まずに R f - 1 遺伝子のみを導入することも可能となった。これは、隣接遺伝子が劣悪形質をもたらす遺伝子である場合に特に重要である。さらに、交雑の場合より早く、1 ~ 2 年の短期間での回復系統を育成も可能となった。

そして、本明細書中の実施例 4 - 1 3 に記載の相補性試験では実際に、図 5 に記載の 1 0 個のクローン由来の断片を用い、アグロバクテリウムを用いる方法により MS コシヒカリ (B T 細胞質を持ち、核遺伝子はコシヒカリとほぼ同一) を形質転換した。その結果、配列番号 2 7 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3、好ましくは、塩基 4 2 3 5 7 - 5 3 7 4 3、より好ましくは、塩基 4 2 1 3 2 - 4 8 8 8 3 の塩基配列を含む核酸によって、稔性回復系統が育成されることが証明された。

限定されるわけではないが、アグロバクテリウムを用いるイネの回復系統の作成方法は、例えば、H i e i e t a l . , P l a n t J . , 6 , p . 2 7 1 - 2 8 2 (1 9 9 4) 、 K o m a r i e t a l . , P l a n t J . , 1 0 , p . 1 6 5 - 1 7 4 (1 9 9 6) 、 D i t t a e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 7 7 : p . 7 3 4 7 - 7 3 5 1 (1 9 8 0) 等に記載されている。

まず、所期の挿入したい核酸断片を含むプラスミドベクターを作成する。プラスミドベクターは、例えば、前記 K o m a r i e t a l . , P l a n t J . , 1 0 , p . 1 6 5 - 1 7 4 (1 9 9 6) らにプラスミドマップが記載さ

れている、pSB11、pSB22等が使用可能である。あるいは、当業者は例えば前記pSB11、pSB22等のプラスミドベクターを基に、自ら適当なベクターを構築する事も可能である。本明細書後述する実施例では、pSB11を基に、ハイグロマイシン耐性遺伝子カセットを持つ中間ベクターpSB200を
5 作成して使用した。具体的には、先ず、ユビキチンプロモーターとユビキチンイントロン (Pubi-ubiI) に、ノパリン合成酵素のターミネーター (Tnos) を接続した。これより得られたPubi-ubiI-Tnos接続体のubiI-Tnos間に、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (HYG (R)) を挿入することにより、Pubi-ubiI-HYG (R) -Tnosからなる接続体を得た。この接続体を、pSB11 (Komariら、上述) のHindIII/
10 EcoRI断片に接続することにより、pKY205を得た。このpKY205のPubi上流に存在するHindIII部位にNotI、NspV、EcoRV、KpnI、SacI、EcoRIの制限酵素部位を追加するためのリンカー配列を挿入することにより、ハイグロマイシン耐性遺伝子カセットを有するpSB
15 B200を得た。

次いで、挿入核酸を含む組換えベクターを用いて大腸菌 (例えばDH5α、JM109、MV1184等、いずれも例えばTAKARA社より購入可能) を形質転換する。

さらに、形質転換された大腸菌を用いて、アグロバクテリウム菌株を好ましくはヘルパー大腸菌株とともに、例えば、Ditta et al (1980) の
20 方法に従い、三菌系交雑 (triparential mating) を行う。限定されるわけではないが、アグロバクテリウムは例えば、Agrobacterium tumefaciens菌株LBA4404/pSB1、LBA4404/pNB1、LBA4404/pSB3等を使用することが可能である。いずれも前述のKomari et al., Plant J., 10, p.
25 165-174 (1996) にプラスミドマップが記載されており、当業者は例えば自らベクター構築を行うことにより使用可能である。限定されるわけではないが、ヘルパー大腸菌は、例えばHB101/pRK2013 (クローンテック社より入手可能) 等が使用可能である。また、より一般的ではないがpRK20

73を保有する大腸菌もヘルパー大腸菌として使用可能との報告がある (L e m
a s e t a l . , P l a s m i d 1992, 27, p. 161-16
3)。

次いで、所期の交配が生じたアグロバクテリウムを用いて、例えば、H i e i
5 e t a l (1994)の方法に準拠し、雄性不稔イネの形質転換を行う。形
質転換に必要なイネ未熟種子は、例えば、雄性不稔イネにジャポニカ品種の花粉
をかけることにより作成できる。

形質転換植物の稔性回復は、例えば出穂約1か月後に、種子稔性を立毛調査す
ることによって調べることが可能である。立毛調査とは、圃場などで栽培されて
10 いる状態で観察する方法である。あるいは、実験室で穂の稔実率を調べる稔実率
調査を行ってもよい。

V. R f - 1 遺伝子の存在の有無の識別方法

本発明においてR f - 1 遺伝子の機能の有無を決定する配列が、イネ第10染
色体上の約65kbの多型検出用マーカー座P4497 M b o IとB5669
15 1 X b a Iの間に存在することが明らかにされた。さらに、相補性試験によ
り、配列番号27の塩基配列のうち、特に塩基38538-54123にR f -
1 遺伝子が完全に含まれていることが確認された。

また、R f - 1 遺伝子を有するインディカ型品種 (I R 2 4) (配列番号2
7) と当該遺伝子を有しないジャポニカ型品種 (あそみのり (配列番号28) お
20 よび日本晴BACクローンA C 0 6 8 9 2 3) の塩基配列を比較し、両者に複数
の多型 (p o l y m o r p h i s m) が存在することが明らかになった。その結
果、R f - 1 遺伝子近傍領域における塩基配列の多型を利用することにより、被
検定イネ個体又は種子がR f - 1 遺伝子を有するか否かを、簡便、迅速かつ正確
に識別することが可能となった。

25 よって、本発明はまた、R f - 1 遺伝子の機能の有無を決定する配列がイネ第
10染色体上の多型検出用マーカー座P4497 M b o IとB56691 X
b a Iの間に存在することを利用して、被検定イネ個体又は種子がR f - 1 遺伝
子を有するか否かを識別する方法を提供する。

多型の検出は公知の任意の方法を使用して行うことが可能である。例えば、制限酵素断片長の多型 (restriction fragment length polymorphism; RFLP) を調べる方法、塩基配列の決定により直接的に決定する方法、ゲノムDNAを8塩基認識制限酵素で切断後、末端を放射能標識し、さらに、6塩基および4塩基認識制限酵素で切断し、2次元電気泳動で展開する方法 (RLGS法、Restriction Landmark Genome Scanning) 等が知られている。さらに、RFLPをポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅・検出する AFLP (amplified fragment length polymorphism; P. Vos, ら、Nucleic Acids Res. Vol. 23, p. 4407-4414 (1995)) 分析も開発されている。

例えば、従来より以下に例示するような RFLP を PCR 増幅を用いて検出する方法 (RFLP マーカーの PCR マーカー化)、マイクロサテライトの多型を PCR 増幅を用いて検出する方法 (マイクロサテライトマーカー) が採用されてきた。

RFLP マーカーの PCR マーカー化

A. RFLP プローブ対応ゲノム領域の多型を利用して PCR マーカー化する方法 (D. E. Harry, B. Temesgen, D. B. Neale; Codominant PCR-based markers for Pinus taeda developed from mapped cDNA clones, Theor. Appl. Genet. (1998) 97: p. 327-336)。これは、RFLP マーカープローブ配列 (「RFLP」は、ある DNA 断片をプローブに用いてサザン解析を行った場合に観察される多型である。プローブに用いた DNA 断片の塩基配列を「RFLP マーカープローブ配列」と呼ぶ。) に対して設計したプライマーを用いてゲノム PCR を行った後、次の二方法のいずれかにより PCR マーカー化できる。第1は、産物を一連の制限酵素で処理し、断片長多型を生じる制限酵素を探索する手法であり、第2は、産物の塩基配列を品種間比較して多型を探索し、その多型を利用して PCR マーカー化する方法である。

B. RFLP原因部位を同定してPCRマーカー化する方法。これは、RFLPマーカープローブ配列内あるいはその周辺（通常数kb以内）に存在するRFLP原因部位（比較する2品種の一方のみが持つ制限酵素認識部位）を同定することにより、PCRマーカー化する方法である。

5 マイクロサテライトマーカー

マイクロサテライトとは、 $(CA)_n$ のような2ないし4塩基程度の繰り返し配列であり、ゲノム中に多数存在している。繰り返し数に品種間多型がある場合、隣接領域に設計したプライマーを用いてPCRを行うと、PCR産物長に多型が観察され、DNA多型を検出することが可能となる。マイクロサテライトを利用した多型検出マーカーは、マイクロサテライトマーカーと呼ばれている

(O. Parnaud, X. Chen, S. R. McCouch, , Mol. Gen. Genet. (1996) 252: p. 597-607)。

本発明において多型の検出方法は特に限定されない。効率、簡便性の観点より、PCRとRFLPを組み合わせ、比較する品種系統間において、PCRにより増幅したDNA断片配列中の制限酵素認識部位に多型が存在する場合に、その制限酵素による切断パターンからいずれの型であるかを決定するPCR-RFLP法が好ましい。PCR-RFLP法は、CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) 法とも呼ばれる。多型が見出される部位に適当な制限酵素認識部位が存在しない場合、PCRの際に制限酵素部位を導入するCAPSの修飾法、dCAPS (derived cleaved amplified polymorphic sequence) も使用可能である (Michaels, S. D. and Amasino, R. M. (1998), The Plant Journal 14 (3) 381-385; A. Koniecznyら, (1993), Plant J. 4 (2) p. 403-410; Neff, M. M., Neff, J. D., Chory, J. and Pepper, A. E. (1998), The Plant Journal 14 (3) 387-392)。以下、より詳細に説明する。

CAPS法、dCAPS法

限定されるわけではないが、本発明の識別方法では

i) R f - 1 遺伝子座において、インディカ品種とジャポニカ品種の塩基配列において多型が見出される部位およびその隣接領域の塩基配列に基づいて、当該塩基配列を増幅するようにプライマー対を作成し；

- 5 i i) 被検定イネ個体又は種子のゲノムDNAを鋳型として核酸増幅反応を行い；そして

i i i) 前記核酸増幅産物に見出される多型に基づいて、被検定イネ個体又は種子がR f - 1 遺伝子を有するか否かを判断する。

工程 i) におけるプライマー対の作成は、好ましくは

- 10 a) 前記核酸増幅産物の多型中に欠失領域を有する型が存在する場合、当該欠失領域の両側に欠失領域を挟むように核酸増幅用プライマー対を作成し、多型検出用マーカーとする；

- 15 b) 前記核酸増幅産物の多型中に制限酵素認識に差異を生じる塩基置換が存在する場合、当該塩基置換部位の両側に置換部位を挟むように核酸増幅用プライマー対を作成し、多型検出用マーカーとする；または

- 15 c) 前記核酸増幅産物の多型中に制限酵素認識に差異を生じない塩基置換が存在する場合、当該塩基置換部位を含み、そして、当該塩基置換部位を含む領域を核酸増幅産物では制限酵素認識に差異を生じるような塩基配列に変更するようなミスマッチ導入用プライマー対を作成し、多型検出用マーカーとする；

- 20 のいずれかの手段を含む。

- 25 限定されるわけではないが、本発明において、R f - 1 遺伝子の存在を識別するために利用可能な適当な多型部位は、例えば、R f - 1 遺伝子を有するインディカ型品種 (I R 2 4) (配列番号 2 7) と当該遺伝子を有しないジャポニカ型品種 (あそみのり (配列番号 2 8) および B A C クローン A C 0 6 8 9 2 3) の塩基配列を比較し、以下のように多型検出用マーカーの作成が可能となるように、適宜選択することができる。

例えば、見出された多型が制限酵素認識部位に差異を生じる場合、当該多型部位の両側に多型部位を挟むように核酸増幅プライマーを作成し、多型検出用に用いる。プライマーを設計する際は、不要な産物を避けるために、反復性の高い配

列に対して設計しない方が好ましい。見出された多型が制限酵素認識に差異を生じない場合、記述の dCAPS 法を適用することにより、マーカーを作成することができる。dCAPS マーカーのプライマーを設計する際は、反復配列に対して設計しない方が好ましいことに加え、多型を識別しやすするため産物長が、
5 好ましくは 50-300 塩基、より好ましくは 100 塩基程度となるようにするとよい。

見出された多型がマイクロサテライトに関するものであれば、当該マイクロサテライトを挟むように核酸増幅用プライマーを作成し、多型検出用に用いる。この場合も、反復配列に対してプライマーを設計しない方が好ましい。

10 1) 核酸増幅

本発明では、好ましくは、解明された被検定イネ個体又は種子の Rf-1 遺伝視座の核酸配列の塩基配列に基づいて、多型を含む隣接領域を増幅するようにプライマー対を作成する。当該プライマーを使用して、被検定イネ個体又は種子のゲノム DNA を鋳型に核酸増幅反応を行う。核酸増幅反応は好ましくは、複製連鎖反応 (PCR) (サイキら、1985, Science 230, p. 1350-1354) である。
15

核酸増幅のためのプライマー対は、多型部位およびその隣接領域の塩基配列に基づき公知の方法により作成することが可能である。具体的には、限定されるわけではないが、例えば、多型部位およびその隣接領域の塩基配列に基づき、以下の条件：
20

- 1) 各プライマーの長さが 15-30 塩基であること；
- 2) 各プライマーの塩基配列中の G+C の割合が 30-70% であること；
- 3) 各プライマーの塩基配列中の A、T、G および C の分布が部分的に大きく偏らないこと；
- 25 4) プライマー対によって増幅される核酸増幅産物の長さが 50-3000 塩基、好ましくは 50-300 塩基であること；そして
- 5) 各プライマー自身の塩基配列中、又はプライマー同士の塩基配列間に相補的な配列部分が存在しないこと

を満たすように、多型部位およびその隣接領域の塩基配列と同じ塩基配列若しくは上記領域に相補的な塩基配列を有する一本鎖DNAを製造し、または、必要であれば多型部位およびその隣接領域の塩基配列に対する結合特異性を失わないように修飾した上記一本鎖DNAを製造する

- 5 ことを含む方法により、プライマー対を作成できる。

本発明において増幅される、多型部位の「隣接領域」とは、多型とその隣接領域の双方を含む領域が、好ましくは、PCR法等の核酸増幅が可能な距離の範囲内にあることを意味する。限定されるわけではないが、好ましくは増幅される隣接領域が約50塩基ないし約3000塩基、より好ましくは約50塩基ないし約
10 2000塩基の範囲内にある。多型を識別しやすするためには、産物長が好ましくは50-300塩基、より好ましくは100塩基程度となるようにするとよい。限定されるわけではないが、隣接領域は、多型部位の5'側または3'側に好ましくは約0塩基ないし約3000塩基、より好ましくは約0塩基ないし約2000塩基、より好ましくは約0塩基ないし約1000塩基の範囲内にある。

- 15 核酸増幅反応の手順及び条件は特に限定されず、当業者に周知である。当業者は、多型部位およびその隣接領域の塩基配列、プライマー対の塩基配列および長さ等の種々の要因に応じて適宜、条件を採用することが可能である。一般には、プライマー対の長さが長い程、G+Cの割合が高いほど、A、T、GおよびCの分布の偏りが小さい程よりストリンジントな条件（より高温でのアニーリング反応および核酸伸長反応、より少ないサイクル数）で核酸増幅反応を行うことが可能である。よりストリンジントな条件の採用により、特異性の高い増幅反応が可能となる。

- 増幅反応は、限定されるわけではないが、例えば、鋳型として使用するゲノムDNA 50 ng、dNTP各200 μ M、Ex TaqTM (TAKARA) 5 U
25 を使用し、例えば、94℃にて2分を1サイクル行った後、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて2分を1サイクルとして30サイクル行い、最後に72℃にて2分を1サイクル行うことにより行うことができる。あるいは、94℃にて2分を1サイクル行った後、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて1分を1サイクルとして30サイクル行い、最後に72℃にて2分を1サイクル

行うことにより行うこともできる。あるいは、別の態様においては、94℃にて2分を1サイクル行った後、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとして35サイクル行い、最後に72℃にて2分を1サイクル行うことにより行うこともできる。

- 5 PCRの鋳型として使用する被検定イネゲノムのDNAは、Edwardsら (Nucleic Acids Res. 8 (6) : 1349, 1991) の方法で、個体又は種子より簡易に抽出することができる。より好ましくは、標準的な方法により精製したDNAを用いるのがよい。CTAB法 (Murray M. G., et al., Nucleic Acids Res. 8 (19) : 4321-5, 1980) は、特に好ましい抽出法である。PCRを行うための鋳型として使用するDNAの濃度は、終濃度で0.5 ng/ μ l が好ましい。

2) 多型検出用マーカの作成

- 15 上記プライマー対を用いた核酸増幅反応により、増幅産物に多型が検出されるか否かを調査し、見出された多型に基づいて多型検出用マーカを作成する。限定されるわけではないが、増幅産物に検出されうる多型としては以下のようなものがある。

a) 前記核酸増幅産物の多型中に欠失領域を有する型が存在する場合

- 20 このような場合、欠失領域の両側に欠失領域を挟むように核酸増幅用プライマー対を作成し、多型検出用マーカとする。欠失領域の大きさが十分な場合、例えば増幅産物をアガロースゲル電気泳動又はアクリルアミドゲル電気泳動等することにより、泳動度の差により多型の検出が可能である。例えば、アガロースゲル電気泳動の場合には塩基対数に約5%以上の差がある場合、シーケンス用アクリルアミドゲル電気泳動の場合には約1塩基以上長さに差がある場合検出可能である。または、欠失領域外の塩基配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはDNA断片を解析用プローブとして、核酸増幅産物に対してハイブリダイゼーションを行うことにより、多型を検出することができる。あるいは、必要に応じ、増幅産物の塩基配列を決定して多型を確認してもよい。核酸の電気泳動、ハイブリダイゼーション、塩基配列の決定等は公知の方法を使用でき、当業

者は適宜採用可能である。このような場合は、増幅産物の長さの相違が直接多型を生じるので、これを利用した多型検出用マーカをALP (amplicon length polymorphism) マーカーと言う。

- b) 前記核酸増幅産物の多型中に制限酵素認識に差異を生じる塩基置換が存在する場合

このような場合、当該塩基置換部位の両側に置換部位を挟むように核酸増幅用プライマー対を作成し、多型検出用マーカとする。このような場合、核酸増幅産物の多型中に制限酵素認識に差異を生じる塩基置換が存在する、即ち、核酸増幅産物中に、特定の1または複数の制限酵素で切断されるものとされないものが存在する。よって、得られた増幅産物を制限酵素処理し、例えばアガロースゲル等で電気泳動し、泳動度の差により多型を検出することが可能である。必要に応じ、増幅産物の塩基配列を決定して多型を確認してもよい。

このような場合、PCR等による増幅産物の制限酵素断片の長さの相違が多型を生じるので、これを利用した多型検出用マーカをCAPSマーカまたはPCR-RFLPマーカという (A. Koniecznyら, 上述)。

後述する実施例1のプライマー対P4497 MboI、P23945 MboI、P41030 TaqI、P45177 BstUI、B59066 BsaJI及びB56691 XbaIがこのような場合に相当する。なお、前記a)の核酸増幅産物の長さで多型を検出可能な場合であっても制限酵素処理を併用することにより、多型がより検出しやすくなる場合がある。

- c) 前記核酸増幅産物の多型中に制限酵素認識に差異を生じない塩基置換が存在する場合

このような場合、当該塩基置換部位を含み、そして、当該塩基置換部位を含む領域を核酸増幅産物では制限酵素認識に差異を生じるような塩基配列に変更するようなミスマッチ導入プライマー対を作成し、多型検出用マーカとする。

具体的には、天然のRf-1遺伝子近傍領域の塩基配列に基づくプライマー対では核酸増幅産物に多型を生じるが制限酵素認識に差異を生じないため、片方または双方のプライマーにミスマッチを導入し、当該塩基置換部位(多型)を含む領域を核酸増幅産物では制限酵素認識に差異を生じるような塩基配列に変更す

る。例えば、PCR法を用いた部位特異的変異の導入による特定ヌクレオチドの置換、欠失又は付加の一般的な技術は、例えばMikaelianら、Nucleic Acids Res. 20:376. 1992に記載された方法を用いることができる。上記ミスマッチ導入プライマーを多型検出用マーカーとして用いた増幅産物では、ミスマッチ導入部位において制限酵素認識に差異を有するため、核酸増幅産物中に、特定の1または複数の制限酵素で切断されるものとされないものが存在する。よって、上述のb)の場合と同様に得られた増幅産物を制限酵素処理し、例えばアガロースゲル等で電気泳動し、泳動度の差により多型を検出することが可能である。

- 10 ミスマッチの導入は、プライマーの標的植物ゲノムへの結合性を失わず、また、多型を生じている塩基置換を変化させるものであってもならない。多型を生じている塩基置換を利用してその近傍にミスマッチを導入して、塩基置換とミスマッチの双方の組み合わせにより制限酵素認識に差異が生じるようにする。このようなミスマッチの導入法は当業者に公知であり、例えば、Michaels, S. D. and Amasino, R. M. (1998)、Neff, M. M., Neff, J. D., Chory, J. and Pepper, A. E. (1998)等に詳述されている。

- このような場合のマーカーは、前述のb)のCAPSマーカーの改良であり、dCAPS (derived CAPS) マーカーという。後述する実施例3のP9493 Bsl Iがこのような場合に相当する。

- なお、上記のb)またはc)の場合において、品種間の多型とは無関係の余分な制限酵素部位が多く存在すると、多型に基づく制限酵素部位認識の相違が識別しにくくなる場合がある。このような場合、必要に応じプライマーにミスマッチを導入し、不必要な制限酵素部位をつぶしてもよい。例えば、実施例3のB60304 Msp Iでは、Rプライマーにミスマッチを導入して多型と無関係なMsp I部位をつぶしている。

限定されるわけではないが、CAPS法又はdCAPS法は、他のRFLP法等と比較していくつかの利点を有する。具体的には、例えば、RFLP法と比較して、少量のサンプルで分析できる。分析に要する時間および労力を大きく軽減

できる、といった利点がある。マイクロサテライトマーカ―と比較しても、作成したPCRマーカ―の多型検出がアクリルアミド電気泳動よりも容易なアガロースゲル電気泳動で行えるという利点がある。

本発明の識別方法の好ましい実施態様

5 以下、例示のために本発明の被検定イネがRf-1遺伝子を有するか否かを識別する方法の好ましい態様を記載する。本明細書の実施例においてRf-1遺伝子を有するインディカ型品種IR24の塩基配列（配列番号27）において、ジャポニカ型品種の対応する領域と比較した結果、少なくとも以下の1）-8）の多型を有することを見出した。

- 10 1) 配列番号27の塩基1239に相当する塩基がAである；
- 2) 配列番号27の塩基6227に相当する塩基がAである；
- 3) 配列番号27の塩基20680に相当する塩基がGである；
- 4) 配列番号27の塩基45461に相当する塩基がAである；
- 5) 配列番号27の塩基49609に相当する塩基がAである；
- 15 6) 配列番号27の塩基56368に相当する塩基がTである；
- 7) 配列番号27の塩基57629に相当する塩基がCである；及び
- 8) 配列番号27の塩基66267に相当する塩基がGである。

よって、本発明の好ましい実施態様において、上記1）-8）の条件のいずれか1つないし全部を満たす場合に、被検定イネの個体又は種子がRf-1遺伝子を有すると判断する。

20 さらに、本発明者らは配列番号27の塩基配列のうち、特に塩基38538-54123、好ましくは、塩基42357-53743、より好ましくは、塩基42132-48883にRf-1遺伝子の機能発現に必須の領域が含まれていることを確認した。よって、本発明の一態様において、配列番号27の塩基配列又は配列番号27の塩基38538-54123の塩基配列と、少なくとも7

25 0%同一の塩基配列が、以下の条件1）及び2）の少なくとも一つを満たす場合に、被検定イネの個体又は種子がRf-1遺伝子を有すると判断する：

- 1) 配列番号27の塩基45461に相当する塩基がAである；及び
- 2) 配列番号27の塩基49609に相当する塩基がAである。

上記の条件を満たすか否かは、公知の多型の検出方法を使用することが可能である。上記配列を含む隣接領域の塩基配列を直接決定してもよい。しかしながら、迅速性、簡便性の観点より、上述したCAPS法又はdCAPS法を採用することが好ましい。CAPS法又はdCAPS法は、例えば以下のように行うことが可能である。

i) 以下のいずれかの塩基、

- 1) 配列番号27の塩基1239に相当する塩基；
- 2) 配列番号27の塩基6227に相当する塩基；
- 3) 配列番号27の塩基20680に相当する塩基；
- 4) 配列番号27の塩基45461に相当する塩基；
- 5) 配列番号27の塩基49609に相当する塩基；
- 6) 配列番号27の塩基56368に相当する塩基；
- 7) 配列番号27の塩基57629に相当する塩基；及び
- 8) 配列番号27の塩基66267に相当する塩基

を含む隣接領域の塩基配列に基づいて、上記塩基と隣接領域の双方を増幅するようにプライマー対を作成し；

i i) 被検定イネ個体又は種子のゲノムDNAを鋳型として核酸増幅反応を行い；そして

i i i) 前記核酸増幅産物に見出される多型に基づいて被検定イネ個体又は種子がRf-1遺伝子の有無を識別する。

核酸増幅反応産物の多型の検出は、限定されるわけではないが、例えば以下の1) - 8) の1つないし全てを満たす場合に被検定イネ個体又は種子がRf-1遺伝子を有すると判断する、ことにより行う。

1) 配列番号27の塩基1239に相当する塩基を含む領域が、MboI認識配列を有しない；

2) 配列番号27の塩基6227に相当する塩基を含む領域が、BslI認識配列を有しない；

3) 配列番号27の塩基20680に相当する塩基を含む領域が、MboI認識配列を有する；

4) 配列番号 27 の塩基 4 5 4 6 1 に相当する塩基を含む領域が、T a q I 認識配列を有しない；

5) 配列番号 27 の塩基 4 9 6 0 9 に相当する塩基を含む領域が、B s t U I 認識配列を有しない；

5 6) 配列番号 27 の塩基 5 6 3 6 8 に相当する塩基を含む領域が、M s p I 認識配列を有しない；

7) 配列番号 27 の塩基 5 7 6 2 9 に相当する塩基を含む領域が、B s a J I 認識配列を有しない；及び

8) 配列番号 27 の塩基 6 6 2 6 7 に相当する塩基を含む領域が、X b a I 認識配列を有しない。

ただし、上記 1) - 8) の領域の各多型を検出可能な制限酵素であれば、上記に限定されるものではない。

本発明の識別方法は、好ましくは、

i) 以下のいずれかの塩基、

15 1) 配列番号 27 の塩基 4 5 4 6 1 に相当する塩基；又は

2) 配列番号 27 の塩基 4 9 6 0 9 に相当する塩基；

を含む隣接領域の塩基配列に基づいて、上記塩基と隣接領域の双方を増幅するようにプライマー対を作成し；

20 i i) 被検定イネ個体又は種子のゲノム DNA を鋳型として核酸増幅反応を行い；そして

i i i) 前記核酸増幅産物に見出される多型に基づいて被検定イネ個体又は種子が R f - 1 遺伝子の有無を識別する。限定されるわけではないが、工程 i i

i) が、以下の条件 1) 及び 2) の少なくとも一つを満たす場合に被検定イネ個体又は種子が R f - 1 遺伝子を有すると判断する：

25 1) 配列番号 27 の塩基 4 5 4 6 1 に相当する塩基を含む領域が、T a q I 認識配列を有しない；及び

2) 配列番号 27 の塩基 4 9 6 0 9 に相当する塩基を含む領域が、B s t U I 認識配列を有しない。

増幅反応に使用するプライマー対は、配列番号 27 の塩基配列に基づき、好ましくは前述した条件を満たすように当業者が適宜選択可能である。好ましくは、配列番号 39 及び 40、配列番号 41 及び 42、配列番号 43 及び 44、配列番号 45 及び 46、配列番号 47 及び 48、配列番号 49 及び 50、配列番号 51 及び 52、並びに配列番号 53 及び 54 からなるグループから選択される塩基配列を有するいずれかのプライマー対を使用する。より好ましくは、プライマー対は、配列番号 45 及び 46、並びに配列番号 47 及び 48 からなるグループから選択される。または、必要であれば上記プライマー対の配列に基づき、多型部位およびその隣接領域の塩基配列に対する結合特異性を失わないように置換、欠失又は付加を施した配列をプライマーとして採用することも可能である。

得られた PCR 産物を、制限酵素断片長多型に関して調べるため、それぞれの PCR マーカーに存在する制限部位に対応する制限酵素で切断する。この切断は、用いる制限酵素の推奨反応温度で数時間～一昼夜インキュベーションすることにより行う。制限酵素で切断したそれぞれの増幅 PCR サンプルは、例えば約 0.7% ないし 2% アガロースゲルあるいは約 3% の MetaPhorTM アガロースゲルで電気泳動することにより解析する。例えば、ゲルをエチジウムブロマイド中紫外線下で可視化する。

本発明の最も好ましい態様において、制限酵素による切断パターンとしては、可視化されたゲル上に、使用するプライマー対に応じて、以下の表 2 のようなバンドの存在の有無が確認される。

表 2

| ----- | | | |
|---------------------------------|---------------|------|---------|
| 検出されるバンドの | | | |
| おおよそのサイズ (bp) | | | |
| ----- | | | |
| P 4 4 9 7 | M o b I による増幅 | 制限酵素 | M b o I |
| (配列番号 39 および 40) | | | |
| 被検定イネゲノムが Rf-1 遺伝子を有する場合 (ホモ) : | | | |
| | | | 7 3 0 |

有しない場合: 385、345

P9493 Bsl I による増幅 制限酵素 Bsl I

(配列番号41および42)

5 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を有する場合 (ホモ): 126

有しない場合: 100、26

P23945 Mbo I による増幅 制限酵素 Mbo I

(配列番号43および44)

10 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を有する場合 (ホモ): 160、100

有しない場合: 260

P41030 Taq I による増幅 制限酵素 Taq I

(配列番号45および46)

15 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を有する場合 (ホモ): 280

有しない場合: 90、190

P45177 Bst UI による増幅 制限酵素 Bst UI

(配列番号47および48)

20 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を有する場合 (ホモ): 20, 65, 730

有しない場合: 20, 65, 175, 555

B60304 Msp I による増幅 制限酵素 Msp I

(配列番号49および50)

25 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を有する場合 (ホモ): 330

有しない場合: 220、110

B59066 Bsa J I による増幅 制限酵素 Bsa J I

(配列番号51および52)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を有する場合（ホモ）： 4 2 0

有しない場合： 6 5、3 5 5

B 5 6 6 9 1 X b a I による増幅 制限酵素 X b a I

5 (配列番号 5 3 および 5 4)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を有する場合（ホモ）： 6 7 0

有しない場合： 1 4 0、5 3 0

- 10 なお、後述の実施例3において、花粉稔性を有するRf-1遺伝子極近傍組換え個体（RS1-RS2、RC1-RC8）について、上記8種のプライマー対を含めた14種の多型マーカーを使用して、Rf-1領域の染色体構成を調べた。その結果、いずれの個体もP9493 B s l I ないし59066 B s a J Iの間については、インディカ型品種由来のRf-1遺伝子を有することが確認された。この結果から、図3で示したような染色体構成をもつ組換え型花粉において、花粉の受精能力があること、すなわち、Rf-1遺伝子が機能していることが示された。これは、これらの組換え型花粉が共有するインディカ型領域、すなわち、最大限に見積もってもP4497 M b o I 座からB56691 X b a I 座までの領域（約65kb）に、Rf-1遺伝子の機能の有無を決定する
- 15
- 20 配列が含まれることを意味する。

- なお、本発明では、交雑による個体の出現頻度からS12564 T s p 5 0 9 I 座とRf-1座とが非常に近接しているとの予測に基づき、染色体歩行を始めた。実際、本発明の高精度分離分析の結果、両座の遺伝的距離は約0.04cMと算出された。現在公知となっているRf-1座連鎖マーカーのなかで、最も
- 25 密接に連鎖しているマーカーは、先述の特開2000-139465に記載されているマーカーのひとつであるが、そのマーカーでもRf-1座との遺伝的距離は1cMと記載されている。イネの場合、平均すると1cMは300kbに相当すると考えられており、特開2000-139465のマーカーを起点に染色体

歩行を開始したのでは、R f - 1 遺伝子領域の絞込みに相当の時間を要したと考えられる。

V I . R f - 1 遺伝子の稔性回復機能の抑制方法

本発明において、稔性回復機能を有する核酸を含む、稔性回復遺伝子 (R f - 1) 座を含む核酸が単離され、その全塩基配列が決定されたことにより、R f - 1 遺伝子の稔性回復機能を遺伝子工学的に制御することが可能となった。よって、本発明は、さらに、R f - 1 遺伝子の稔性回復機能を抑制する方法を提供する。

本発明の R f - 1 遺伝子の稔性回復機能を抑制する方法は、例えば、配列番号 27 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基配列と少なくとも 70 % 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸、に対し相補的な塩基配列から選択される、連続した少なくとも 100 塩基の長さのアンチセンスを導入する、ことを含む。

本発明の R f - 1 遺伝子の稔性回復機能を抑制する方法は、一態様において、配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3、好ましくは、塩基 4 2 3 5 7 - 5 3 7 4 3、より好ましくは、塩基 4 2 1 3 2 - 4 8 8 8 3 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3、好ましくは、塩基 4 2 3 5 7 - 5 3 7 4 3、より好ましくは、塩基 4 2 1 3 2 - 4 8 8 8 3 の塩基配列と少なくとも 70 % 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸、に対し相補的な塩基配列から選択される、連続した少なくとも 100 塩基の長さのアンチセンスを導入することを含む。

アンチセンスは、少なくとも 100 塩基以上、より好ましくは 500 塩基以上、最も好ましくは 1000 塩基以上の長さである。導入の技術上の簡便性等の観点より、好ましくは 10000 塩基以下、より好ましくは 5000 塩基以下である。アンチセンスは、公知の方法により合成することが可能である。アンチセンスのイネへの導入は公知の方法により、例えば、T e r a d a e t a l . (P l a n t C e l l P h y s i o l . 2 0 0 0 J u l , 4 1 (7) , p . 8 8 1 - 8 8 8) に記載の方法により行うことが可能である。

また、限定されるわけではないが、Tos17 (Hirochika H. et al. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, p. 7783-7788) などの転移因子の挿入変異系統のなかから、配列番号27の塩基配列内に転移因子が挿入された系統を選抜することにより、Rf-1が破壊された系統を育成することも可能であると考えられる。さらに、植物においても相同組換えにより遺伝子破壊が研究されている。その系の確立により、配列番号27の塩基配列を有する核酸、または配列番号27の塩基配列と少なくとも70%同一である核酸を用いて、Rf-1遺伝子を変異型Rf-1遺伝子に置換することにより、稔性回復機能を抑制することも可能であると考えられる。

参考文献

1. Fukuta et al. 1992, Jpn J. Breed. 42 (supl. 1) p. 164-165
2. 特開平7-222588
3. 特開平9-313187
4. 特開2000-139465
5. Harushima et al. 1998, Genetics 148 p. 479-494
6. Michaels and Amasino 1998, The Plant Journal 14 (3) p. 381-385
7. Neff et al. 1998, The plant Journal 14 (3) p. 387-392
8. D. E. Harry, et al., Theor Appl Genet (1998) 97: p. 327-336
9. Hiei et al., Plant Journal (1994), 6 (2), p. 272-282
10. Komari et al., Plant Journal (1996) 10, p. 165-174

11. Ditt a et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980), 77:p. 7347-7351
12. P. Vos, 他, Nucleic Acids Res. Vol. 23, p. 4407-4414 (1995)
- 5 13. O. Parnaud, X. 他, Mol. Gen. Genet. (1996) 252:p. 597-607
14. A. Konieczny 他, (1993), Plant J. 4 (2) p. 403-410
15. Edwards 他, Nucleic Acids Res. 8 (6): 1349, 1991
- 10 16. Murray M. G. 他, Nucleic Acids Res. 8 (19): 4321-5, 1980
17. Terada et al., Plant Cell Physiology 41 (7), p. 881-888
- 15 18. Hirochika H. et al. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, p. 7783-7788

実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の技術的
20 範囲を限定するためのものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に
本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれ
る。

参考例

以下の参考例は、本出願人の先の特許出願 特願2000-247204 (2
25 000年8月17日出願) に記載された実施例に基づく。

参考例1 Rf-1遺伝子座周辺RFLPマーカーのPCRマーカー化

本参考例においては、Rf-1遺伝子座周辺RFLPマーカー9個 (R187
7、G291、R2303、S12564、C1361、S10019、G40
03、S10602、G2155) をPCRマーカー化した。

(1) 材料および方法

R f - 1 遺伝子座周辺 R F L P マーカー 9 個 (R 1 8 7 7、G 2 9 1、R 2 3
0 3、S 1 2 5 6 4、C 1 3 6 1、S 1 0 0 1 9、G 4 0 0 3、S 1 0 6 0 2、
G 2 1 5 5) を農林水産省農業生物資源研究所から購入し、ベクター内の挿入塩
5 基配列を決定した後、以下の手順で実験を行った。なお、本文中のイネ品種のう
ち、あそみのりはジャポニカ米であり、I R 2 4 はインディカ米である。

(2) ゲノミックライブラリーの作製

あそみのりの緑葉から、C T A B 法により各々トータル DNA を抽出した。M
b o I で部分消化後、N a C l 密度勾配遠心 (6 ~ 2 0 % 直線勾配、2 0 ° C、3
10 7 0 0 0 r p m、4 時間、全容量 1 2 m l) によりサイズ分画を行った。各分画
(約 0. 5 m l) の一部を電気泳動にかけ、1 5 ~ 2 0 k b の DNA を含む分画
を選抜・精製した。ライブラリーの作製は、L a m b d a D A S H I I
(S t r a t a g e n e) をベクターに用いて、付属プロトコールに準拠して行
った。パッケージングには、G i g a P a c k I I I G o l d (S t r
15 a t a g e n e) を用いた。パッケージング後、S M B u f f e r 5 0 0
 μ l およびクロロフォルム 2 0 μ l を添加した。遠心後の上清にクロロフォルム
2 0 μ l を添加し、ライブラリー溶液とした。

ライブラリー溶液の 5 0 倍希釈液 5 μ l を用いて、X L - 1 B l u e M
R A (P 2) に感染させた。その結果、あそみのりについては 8 3 個のブランク
20 が出現した。ライブラリーあたりでは、 $4. 1 5 \times 1 0^5$ p f u となり、平均挿
入断片長を 2 0 k b とすると、 $8. 3 \times 1 0^9$ b p をカバーする計算になる。こ
れは、イネゲノム ($4 \times 1 0^8$ b p) に対して十分な大きさのライブラリーであ
ると考えられた。

(3) R 1 8 7 7、C 1 3 6 1 および G 4 0 0 3 対応ゲノミッククローンの単 25 離

C 1 3 6 1 および G 4 0 0 3 については、R F L P マーカープローブを含むプ
ラスミドを単離した後、制限酵素処理・電気泳動により、R F L P マーカープ
ローブ部分を分離し、DNA 回収フィルター (T a k a r a S U P R E C - 0
1) を用いて目的の DNA を回収した。R 1 8 7 7 については、マーカープロー

ブ両端部に対してプライマーを設計し、あそみのりトータルDNAをテンプレートにPCRを行い、産物を電気泳動後、前述の方法で回収した。回収したDNAは、rediprime DNA labelling system (Amersham Pharmacia) を用いてラベルし、ライブラリースクリーニング用プローブとした。なお、PCRは常法により行った（以下、同様）。

ライブラリーのスクリーニングは、プラークをHybond-N+ (Amersham Pharmacia) にブロットした後、常法により行った。1stスクリーニング後、陽性プラーク周辺を打ち抜き、SMバッファーに懸濁し、2ndスクリーニングに供試した。2ndスクリーニング後、陽性プラークを打ち抜き、さらに3rdスクリーニングを行い、単一プラークを分離した。

分離した目的プラークをSMバッファーに懸濁後、プレートライセート法によりファージを一次増殖した。得られたファージ増殖液を用いて、振とう培養法により二次増殖を行った後、Lambda starter kit (QIAGEN) を用いてファージDNAを精製した。

各マーカーについて、8枚のプレートを用いて1stスクリーニングを行った。プレート1枚につきライブラリー溶液を10 μ l使用した。3rdスクリーニングまで行った結果、R1877、C1361およびG4003対応ゲノミッククローンを、それぞれ、4個、3個および3個単離した。

(4) R1877のPCRマーカー化

単離したゲノミッククローンを解析し、RFLPの原因部位、即ち、IR24 (インディカ米) には存在しあそみのり (ジャポニカ米) には存在しないEcoRI部位を同定することにより、PCRマーカー化を行った。

具体的には、単離した4クローンについて以下の解析を行った。まず、T3およびT7プライマーを用いて、各クローンの挿入断片の両末端の塩基配列を明らかにした。つぎに、マーカープローブ両端部に対して外向きのプライマーを設計し、T3およびT7プライマーと組み合わせ（合計4プライマー組合せ）、各クローンをテンプレートにPCRを行った。

また、各クローンをNotIおよびEcoRIで消化した後、電気泳動することにより、挿入断片長および各EcoRI断片長を推定した。

これらの解析の結果、各クローンの位置関係を明らかにすることができた。一方、RFLP解析ではマーカープロブR1877により日本晴（ジャポニカ米）では20kb、Kasalath（インディカ米）では6.4kbのEcoRI断片が検出されること（ftp://ftp.staff.or.jp/pub/geneticmap98/parentsouthern/chr10/R1877.JPG）ことが知られている。これらの事実を併せ考えることにより、IR24には存在しあそみのりには存在しないEcoRI部位のおおよその位置が推定できた。そこで、その周辺を増幅するように設計したプライマー組合せ（配列番号1と配列番号2）を用いて、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて2分を1サイクルとし30サイクルのPCR条件にてゲノミックPCRを行った。得られたPCR産物をEcoRI処理した後、0.7%アガロースゲルで電気泳動した。

その結果、あそみのり-IR24間で期待通りの多型が観察された。すなわち、PCR産物（約3200bp）のEcoRI処理により、IR24では1500bpと1700bpとに切断されるのに対し、あそみのりでは切断されなかった。あそみのり-IR24のRIL（Recombinant Inbred Line）を用いてこのPCRマーカーをマッピングした結果、RFLPマーカー座R1877と同一領域に位置づけられ、RFLPマーカーR1877がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーをR1877EcoRIと命名した。

(5) G4003のPCRマーカー化

単離したゲノミッククローンを解析し、RFLPの原因部位、即ち、あそみのりには存在しIR24には存在しないHindIII部位を同定することにより、PCRマーカー化を行った。

R1877と同様の解析を行い、単離した3クローンの位置関係を明らかにした。RFLP解析ではマーカープロブG4003により日本晴（ジャポニカ米）では3kb、Kasalathでは10kb（インディカ米）のHindIII断片が検出されること（ftp://ftp.staff.or.jp/pub/geneticmap98/parentsouthern/chr10

／R1877. JPG) ことが知られている。これらの事実を併せ考えることにより、あそみのりには存在しIR24には存在しないHindIII部位が、2個の候補部位のいずれかであると推定された。そこで、各HindIII部位周辺を増幅するように設計したプライマー組合せ（配列番号3および配列番号4）を用いて、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルの条件で、ゲノミックPCRを行った。得られたPCR産物をHindIII処理後、2%アガロースゲルで電気泳動したところ、マーカープローブ内部のHindIII部位が多型部位であることが示された。すなわち、PCR産物（362bp）のHindIII処理により、あそみのりでは95bpと267bpとに切断されるのに対し、IR24では切断されなかった。マッピングの結果、RFLPマーカーG4003がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーをG4003 HindIII（配列番号19）と命名した。

(6) C1361のPCRマーカー化

単離したゲノミッククローンの塩基配列情報に基づいてプライマーを設計した。あそみのりおよびIR24のトータルDNAをテンプレートにPCRを行い、産物を電気泳動後、既述の方法で回収した。回収したDNAをテンプレートに用いて、ABI Model 310により各品種の塩基配列を解読し、多型作出に利用可能な変異を探索した。

R1877と同様の解析を行い、単離した3クローンのおおよその位置関係を明らかにすることはできた。しかし、C1361マーカー周辺にはPCR増幅しにくい領域や塩基配列を解読できない領域が存在することが明らかになり、RFLP原因部位を同定することは困難であると考えられた。そこで、比較的長いPCR産物（2.7kb）が得られる領域に着目し、dCAPS化を試みることにした。

具体的には、あそみのり、コシヒカリ（以上、ジャポニカ米）及びKasath、IR24（以上、インディカ米）を用いて、前記領域のゲノミックPCR産物の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米・インディカ米間で多型を示す部位を6ヶ所見出すことができた。そのうちのひとつについて、dCAPS化を

行った。この過程で、プライマーとして配列番号5および配列番号6を用い、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をMwo I 処理後、3%MetaPhorTMアガロースで電気泳動することにより解析した。

- 5 あそみのりでは2箇所切断され、約25bp、50bp、79bpのバンドが観察され、IR24では1箇所切断され、約50bp、107bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーC1361がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーをC1361 Mwo I (配列番号20) と命名した。

10 (7) G2155のPCRマーカー化

マーカープローブ両端部に対してプライマーを設計し、あそみのり、コシヒカリ、IR24およびIL216 (戻し交雑によりコシヒカリにRf-1遺伝子を導入した系統、遺伝子型はRf-1/Rf-1) のトータルDNAをテンプレートにPCRを行った。PCR産物の精製および多型作出に利用可能な変異の探索は、既述の方法で行った。

- 15 具体的には、供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、Rf-1遺伝子保有品種系統 (IR24およびIL216) とRf-1遺伝子非保有品種系統 (あそみのりおよびコシヒカリ) との間の変異が3ヶ所見出された。そのうちのひとつを利用して、dCAPS化を行った。この過程で、プライマーとして配列番号7及び配列番号8を用い、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をMwo I 処理後、3%MetaPhorTMアガロースで電気泳動することにより解析した。あそみのりでは1箇所切断され、約25bp及び105bpのバンドが観察され、IR24では2箇所切断され、約25bp、27bp及び78bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーG2155がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーをG2155 Mwo I (配列番号21) と命名した。

25 (8) G291のPCRマーカー化

マーカープローブ内部配列に対してプライマーを設計し、種々のプライマー組合わせでPCRを行い、期待される大きさの増幅産物が得られるプライマー組合わせを探索した。探索により見出したプライマー組合わせで、あそみのり、コシヒカリ、IR24およびIL216のトータルDNAをテンプレートにPCRを行
5 行った。PCR産物の精製および多型作出に利用可能な変異の探索は、既述の方法で行った。

具体的には、マーカープローブ配列に対して設計したプライマーを用いて、供試品種のゲノミックPCRを行い、産物の塩基配列を比較した。その結果、Rf-1遺伝子保有品種系統（IR24およびIL216）とRf-1遺伝子非保有
10 品種系統（あそみのりおよびコシヒカリ）との間の変異が4ヶ所見出された。そのうちのひとつを利用して、dCAPS化を行った。この過程で、プライマーとして配列番号9及び配列番号10を用い、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行
15 った。得られたPCR産物をMspI処理後、3%MetaPhor™アガロースで電気泳動することにより解析した。Rf-1遺伝子保有品種系統では2箇所
で切断され、約25bp、49bp及び55bpのバンドが観察され、Rf-1遺伝子非保有品種系統では1箇所
で切断され、約25bp及び104bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーク291がPCRマ
20 ーカーに変換されたことが証明され、このマーカーク291 MspI（配列番号22）と命名した。

(9) R2303のPCRマーカーク化

マーカープローブ内部配列に対してプライマーを設計し、あそみのり（ジャポニカ米）、IR24およびKasalath（インディカ米）のトータルDNAをテンプレートにPCRを行
25 った。産物の精製および多型作出に利用可能な変異の探索は、既述の方法で行った。

供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米ーインディカ米間の変異が見出された。この変異は、BslI認識部位に生じていたので、そのままCAPSマーカーとした。この過程で、プライマーとして配列番号11及び配列番号12を用い、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて2分を1サ

イクルとし30サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をB s l I 処理後、2%アガロースで電気泳動することにより解析した。ジャポニカ米では1箇所切断され、約238bp及び1334bpのバンドが観察され、インディカ米では2箇所切断され、約238bp、655bp及び679bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーR2303がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーをR2303 B s l I (配列番号23)と命名した。

(10) S10019のPCRマーカー化

S10019のPCRマーカー化は、上記R2303のPCRマーカー化の方法(9)にしたがって行った。

具体的には、供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米ーインディカ米間の変異が見出された。この変異は、B s t U I 認識部位に生じていたので、そのままCAPSマーカーとした。この過程で、プライマーとして配列番号13及び配列番号14を用い、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて1分を1サイクルとし30サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をB s t U I 処理後、2%アガロースで電気泳動することにより解析した。ジャポニカ米では1箇所切断され、約130bp及び462bpのバンドが観察され、インディカ米では2箇所切断され、約130bp、218bp及び244bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーS10019がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーをB s t U I (配列番号24)と命名した。

(11) S10602のPCRマーカー化

S10602のPCRマーカー化は、上記R2303のPCRマーカー化の方法(9)にしたがって行った。

具体的には、供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米ーインディカ米間の変異が見出された。その変異を利用して、CAPS化を行った。この過程で、プライマーとして配列番号15及び配列番号16を用い、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて1分を1サイクルとし33サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をK p n I 処理後、2%

アガロースで電気泳動することにより解析した。ジャポニカ米では1箇所切断され、約117bp及び607bpのバンドが観察され、インディカ米では切断されず、724bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカ－S10602がPCRマーカ－に変換されたことが証明され、このマーカ－を

5 S10602 KpnI (配列番号25) と命名した。

(12) S12564のPCRマーカ－化

S12564のPCRマーカ－化は、R2303のPCRマーカ－化の方法にしたがって行った。

具体的には、供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米ー

10 インディカ米間の変異が見出された。その変異を利用して、dCAPS化を行った。この過程で、プライマーとして配列番号17及び配列番号18を用い、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をTsp509I処理後、3%MetaPhorTMアガロースで電気泳動することにより解析し

15 た。ジャポニカ米では2箇所切断され、26bp、41bp及び91bpのバンドが観察され、インディカ米では1箇所切断され、41bp及び117bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカ－S12564がPCRマーカ－に変換されたことが証明され、このマーカ－をS12564 Tsp509I (配列番号26) と命名した。

20 参考例2 Rf-1遺伝子座のマッピング

MSコシヒカリにMS-FRコシヒカリの花粉をかけて作成したF1集団1042個体の幼苗からDNAを抽出し、分析に供試した。ここで、MSコシヒカリとは、細胞質をBT型雄性不稔細胞質に置換したコシヒカリである(世代:BC10F1)。また、MS-FRコシヒカリとは、IR8(農業生物資源研究所より入手)に由来するRf-1遺伝子をMSコシヒカリに導入した系統である(Rf-1遺伝子座ヘテロ)。

25

まず、Rf-1遺伝子座を挟むと考えられる、参考例1に記載の2個のマーカ－座R1877 EcoRIおよびG2155 MwoIにおける各個体の遺伝子型を調査した。R1877 EcoRI座またはG2155 MwoI座

に関してジャポニカ米型ホモ個体を、これら2マーカー座間での組換え体とみなした。つぎに、各組換え体について、さらに、G291 MspI座、R2303 BslI座、S12564 Tsp509I座、C1361 MwoI座、S10019 BstUI座、G4003 HindIII座およびS10602 KpnI座の遺伝子型を調査し、組換え位置を同定した。

R1877 EcoRI座およびG2155 MwoI座に関する遺伝子型調査の結果、稔性を回復した46個体がRf-1遺伝子座付近での組換え体であることが明らかになった。これら組換え体について、Rf-1遺伝子座近傍マーカー座の遺伝子型を調査した結果を表3に示す。

表3 Rf-1座近傍組換え個体のマーカー座遺伝子型

| Locus | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| R1877 EcoRI | J | J | J | J | J | J | J | J | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| G291 MspI | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| R2303 BslI | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| S12564 Tsp509I | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| C1361 MwoI | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| S10019 BstUI | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| G4003 HindIII | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| S10602 KpnI | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| G2155 MwoI | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |

J コシヒカリ型ホモ
H コシヒカリ型MS-FRコシヒカリ型ヘテロ

表3に示されたように、S12564 Tsp509I マーカーがジャポニカ型である個体8と、C1361 MwoI 座マーカーがジャポニカ型である個体9および個体10が得られた。いずれも稔性を回復した個体であることから、前者はRf-1 座とS12564 Tsp509I 座との間での組換え個体、Rf-1 座とC1361 MwoI 座との間での組換え個体と解し、Rf-1 遺伝子はS12564 Tsp509I 座とC1361 MwoI 座との間に存在することが判明した。上記交配において、BT型雄性不稔細胞質を持つ個体では、Rf-1 遺伝子をもつ花粉のみが受精能力を持つとの報告 (C. Shinjyo, JAPAN. J. GENETICS Vol. 44, No. 3:149-156 (1969)) に基づいて、Rf-1 遺伝子座を詳細連鎖地図上に位置づけることができた (図4)

実施例1 Rf-1 座極近傍組換え個体の獲得

(材料および方法)

MSコシヒカリ (世代: BC10F1) にMS-FRコシヒカリ (世代: BC9F1、Rf-1 座ヘテロ) の花粉をかけて作成したBC10F1集団4103個体を用い、各個体からDNAを抽出し、上記参考例2と同様に、S12564 Tsp509I 座およびC1361 MwoI 座の遺伝子型を調査した。S12564 Tsp509I 座の遺伝子型がコシヒカリ型ホモ個体を、Rf-1 座とS12564 Tsp509I 座との間での組換えにより生じた個体とみなし、C1361 MwoI 座の遺伝子型がコシヒカリ型ホモ個体を、Rf-1 座とC1361 MwoI 座との間での組換えにより生じた個体とみなした。

(結果および考察)

4103個体を調査した結果、Rf-1 座とS12564 Tsp509I 座との間での組換え個体を1個体、Rf-1 座とC1361 MwoI 座との間での組換え個体を6個体見出した。一方、上記参考例2において交配により得られた1042個体を調査した結果、表3に示したように、Rf-1 座とS12564 Tsp509I 座との間での組換え個体を1個体、Rf-1 座とC1361 MwoI 座との間での組換え個体を2個体見出している。

合計すると、5145個体から、Rf-1座とS12564 Tsp509I座との間での組換え個体を2個体、Rf-1座とC1361 MwoI座との間での組換え個体を8個体獲得できたことになる。これら10個体を以下の実施例における高精度分離分析に供試することにした。

5 実施例2 染色体歩行

(1) 1回目染色体歩行

(材料および方法)

ジャポニカ品種あそみのり (Rf-1非保有品種) のゲノムDNAを用いて、参考例1に記載したようにLambda DASH IIベクターによりゲノミ
10 ックライブラリーを作成し、染色体歩行に供試した。

RFLPプローブ S12564の部分塩基配列 (アクセッション番号D47284) に対して次のプライマー対:

5' -atcaggagccttcaaattgggaac-3' (配列番号29) および

5' -ctcgcaaattgcttaattttgacc-3' (配列番号30)

15 を設計し、あそみのりトータルDNAをテンプレートに用いて、定法に従いPCRを行った。得られた約1200bpの増幅産物を、アガロースゲルでの電気泳動後、QIAEXII (QIAGEN社) を用いて精製した。精製したDNAは、rediprime DNA labelling system (Amersham Pharmacia社) を用いてラベルし、ライブラリースクリーニング用プローブ (プローブA、図1) とした。
20

ライブラリーのスクリーニングは、ブランクをHybond-N⁺ (Amersham Pharmacia社) にプロットした後、常法により行った。単一ブランクを分離した後、Lambda Midi kit (QIAGEN社) を用いてプレートライセート法によりファージDNAを精製した。

25 (結果および考察)

スクリーニングにより4個のクローンが得られ、末端塩基配列の解析および制限酵素断片長解析の結果から、そのうちのふたつ (WSA1およびWSA3) は図1に示した位置関係にあることが示された。プライマー歩行により、WSA1

およびWSA3に対応するあそみのりゲノム塩基配列を決定した（DNAシーケンサー377、ABI社）。

（2）2回目染色体歩行

（材料および方法）

- 5 既述のあそみのりゲノミックライブラリーに加え、インディカ品種IR24（Rf-1保有品種）のゲノムDNAから同様に作成したIR24ゲノミックライブラリーを、染色体歩行に供試した。

（1）で明らかにしたあそみのりゲノム塩基配列に対して次のプライマー対：

- 5' - tgaaggagttatgggtgcgtgacg - 3' （配列番号31）および
10 5' - ttgccgagcacacttgccatgtgc - 3' （配列番号32）
を設計し、WSA3のDNAをテンプレートに用いて、定法に従いPCRを行った。得られた524bpの増幅産物を、既述の方法で精製・ラベルし、ライブラリースクリーニング用プローブ（プローブE、図1）とした。

- ライブラリーのスクリーニングおよびファージDNAの精製は、既述の方法で
15 行った。

（結果および考察）

- あそみのりゲノミックライブラリースクリーニングにより15個のクローンが得られ、末端塩基配列の解析および制限酵素断片長解析の結果から、そのうちのひとつ（WSE8）は図1に示した位置関係にあることが示された。プライマー
20 歩行により、WSE8に対応するあそみのりゲノム塩基配列を決定した。

- IR24ゲノミックライブラリースクリーニングにより7個のクローンが得られ、末端塩基配列の解析および制限酵素断片長解析の結果から、そのうちのふたつ（XSE1およびXSE7）は図1に示した位置関係にあることが示された。プライマー歩行により、XSE1およびXSE7に対応するIR24ゲノム塩基
25 配列を決定した。

（3）3回目染色体歩行

（材料および方法）

既述のあそみのりゲノミックライブラリーおよびIR24ゲノミックライブラリーを、染色体歩行に供試した。

(2) で明らかにしたあそみのりゲノム塩基配列に対して次のプライマー対：

5' -gcgacgcaatggacatagtgctcc- 3' (配列番号33) および

5' -ttacctgccaagcaatatccatcg- 3' (配列番号34)

を設計し、WSE8のDNAをテンプレートに用いて、定法に従いPCRを行った。得られた1159bpの増幅産物を、既述の方法で精製・ラベルし、ライブラリスクリーニング用プローブ(プローブF、図1)とした。

ライブラリーのスクリーニングおよびファージDNAの精製は、既述の方法で行った。

(結果および考察)

10 あそみのりゲノミックライブラリスクリーニングにより8個のクローンが得られ、末端塩基配列の解析および制限酵素断片長解析の結果から、そのうちのふたつ(WSF5およびWSF7)は図1に示した位置関係にあることが示された。プライマー歩行により、WSF5およびWSF7に対応するあそみのりゲノム塩基配列を決定した。

15 IR24ゲノミックライブラリスクリーニングにより13個のクローンが得られ、末端塩基配列の解析および制限酵素断片長解析の結果から、そのうちのふたつ(XSF4およびXSF20)は図1に示した位置関係にあることが示された。プライマー歩行により、XSF4およびXSF20に対応するIR24ゲノム塩基配列を決定した。

20 (4) 4回目染色体歩行

(材料および方法)

既述のあそみのりゲノミックライブラリーおよびIR24ゲノミックライブラリーを、染色体歩行に供試した。

(3) で明らかにしたあそみのりゲノム塩基配列に対してプライマー対：

25 5' -aaggcatactcagtgagggaag- 3' (配列番号35) および

5' -ttaacctgaccgcaagcacctgtc- 3' (配列番号36)

を設計し、WSF7のDNAをテンプレートに用いて、定法に従いPCRを行った。得られた456bpの増幅産物を、既述の方法で精製・ラベルし、ライブラリスクリーニング用プローブ(プローブG、図1)とした。

ライブラリーのスクリーニングおよびファージDNAの精製は、既述の方法で行った。

(結果および考察)

あそみのりゲノミックライブラリースクリーニングにより6個のクローンが得られ、末端塩基配列の解析および制限酵素断片長解析の結果から、そのうちのふたつ(WSG 2およびWSG 6)は図1に示した位置関係にあることが示された。プライマー歩行により、WSG 2およびWSG 6に対応するあそみのりゲノム塩基配列を決定した。

IR 24ゲノミックライブラリースクリーニングにより14個のクローンが得られ、末端塩基配列の解析および制限酵素断片長解析の結果から、そのうちの3クローン(XSG 8、XSG 16およびXSG 22)は図1に示した位置関係にあることが示された。プライマー歩行により、XSG 8、XSG 16およびXSG 22に対応するIR 24ゲノム塩基配列を決定した。

(5) 5回目染色体歩行

(材料および方法)

既述のIR 24ゲノミックライブラリーを、染色体歩行に供試した。

本発明者らは、TIGR(The Institute for Genomic Research)の公開ホームページを閲覧し、RFLPマーカーS12564を包含するBAC(Bacterial Artificial Chromosome)クローン(アクセッション番号AC068923)が公開データベース(GenBank)に登録されていることを見出した。このBACクローンは、ジャポニカ品種日本晴のゲノムDNAを含むものであり、塩基配列を比較したところ、(1) - (4)で作成したあそみのりおよびIR 24のコンテ

そこで、このBACクローンの一部を増幅する次のプライマー対：

5' - tggatggactatgtggggtcagtc - 3' (配列番号37) および

5' - agtgggaagtggagagagtagggag - 3' (配列番号38)

を設計し、I R 2 4 トータルDNAをテンプレートに用いて、定法に従いPCRを行った。得られた約600bpの増幅産物を、既述の方法で精製・ラベルし、ライブラリースクリーニング用プローブ（プローブH、図1）とした。

ライブラリーのスクリーニングおよびファージDNAの精製は、既述の方法で行った。

（結果および考察）

I R 2 4 ゲノミクライブラリースクリーニングにより15個のクローンが得られ、末端塩基配列の解析および制限酵素断片長解析の結果から、そのうちのひとつ（X S H 1 8）は図1に示した位置関係にあることが示された。プライマー歩行により、X S H 1 8に対応するI R 2 4 ゲノム塩基配列を決定した。

実施例3 高精度分離分析

（1）PCRマーカーP 4 4 9 7 M b o I の開発

実施例2で明らかにしたI R 2 4 コンティグに対応するゲノム塩基配列（配列番号27）とあそみのりコンティグに対応するゲノム塩基配列（配列番号28）とを比較した結果、配列番号27の1239番目の塩基がAであるのに対し、当該位置に対応する配列番号28の12631番目の塩基はGであることを見出した。

この差異の検出には、先ず次のプライマー対：

20 P 4 4 9 7 M b o I F :

5' -ccctccaacacataaatggttgag-3' （配列番号39）

（配列番号27の塩基853-876に相当）

（配列番号28の塩基12247-12270に相当）

および

25 P 4 4 9 7 M b o I R :

5' -tttctgccaggaaactgttagatg-3' （配列番号40）

（配列番号27の塩基1583-1560に相当）

（配列番号28の塩基12975-12952に相当）

を用いて当該部位周辺のPCR増幅を行い約730bpの断片を増幅する。増幅産物をMboI処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、IR24DNAからの増幅産物はMboIの認識配列(GATC)をもたず、MboI処理により切断されないのに対し、あそみのりDNAからの増幅産物はMboIの認識配列をもち、MboI処理により切断されるため、MboI処理後のDNA鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

(2) PCRマーカーP9493 BslIの開発

実施例2で明らかにしたIR24コンティグに対応するゲノム塩基配列(配列番号27)とあそみのりコンティグに対応するゲノム塩基配列(配列番号28)とを比較した結果、配列番号27の6227番目の塩基がAであるのに対し、当該位置に対応する配列番号28の17627番目の塩基はCであることを見出した。

この差異の検出には、先ず次のプライマー対:

15 P9493 BslI F:

5' -gcgatccttatacgcatactatgcg-3' (配列番号41)

(配列番号27の塩基6129-6152に相当)

(配列番号28の塩基17529-17552に相当)

および

20 P9493 BslI R:

5' -aaagtctttgttccttcaccaagg-3' (配列番号42)

(配列番号27の塩基6254-6231に相当)

(配列番号28の塩基17654-17631に相当)

を用いて当該部位周辺のPCR増幅を行い126bpの断片を増幅する。増幅産物をBslI処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、IR24DNAからの増幅産物はBslIの認識配列(CCNNNNNNNGG)をもたず、BslI処理により切断されないのに対し、あそみのりDNAからの増幅産物はBslIの認識配列をもち、BslI処

理により切断されるため、B s l I 処理後のDNA鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

5 なお、本マーカーの開発には、dCAPS法 (M i c h a e l s a n d A
m a s i n o 1 9 9 8, N e f f e t a l 1 9 9 8) を適用した。具
体的には、前記P 9 4 9 3 . B s l I Rプライマーの使用により、配列番号2
7の6 2 3 6および配列番号2 8の1 7 6 3 6のaがgに置換される。これによ
り、あそみのりDNA由来の断片は、配列番号2 8の1 7 6 2 6 - 1 7 6 3 6の
部分の配列がC C t t t c c t t G Gとなり、B s l I 処理により切断される。

(3) P C RマーカーP 2 3 9 4 5 M b o I の開発

10 実施例2で明らかにしたI R 2 4コンティグに対応するゲノム塩基配列 (配列
番号2 7) とあそみのりコンティグに対応するゲノム塩基配列 (配列番号2 8)
とを比較した結果、配列番号2 7の2 0 6 8 0番目の塩基がGであるのに対し、
当該位置に対応する配列番号2 8の3 2 0 7 9番目の塩基はAであることを見出
した。

15 この差異の検出には、先ず次のプライマー対：

P 2 3 9 4 5 M b o I F :

5' - gaggatttatcaaaacaggatggacg - 3' (配列番号4 3)

(配列番号2 7の塩基2 0 5 1 9 - 2 0 5 4 4に相当)

(配列番号2 8の塩基3 1 9 1 8 - 3 1 9 4 3に相当)

20 および

P 2 3 9 4 5 M b o I R :

5' - tgggcggcagcagtgaggataga - 3' (配列番号4 4)

(配列番号2 7の塩基2 0 7 7 8 - 2 0 7 5 5に相当)

(配列番号2 8の塩基3 2 1 7 7 - 3 2 1 5 4に相当)

25 を用いて当該部位周辺のP C R増幅を行い2 6 0 b pの断片を増幅する。増幅産
物をM b o I 処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化するこ
とができる。すなわち、I R 2 4 DNAからの増幅産物はM b o I の認識配列
(G A T C) をもち、M b o I 処理により切断されるのに対し、あそみのりD N
Aからの増幅産物はM b o I の認識配列をもたず、M b o I 処理により切断され

ないため、M b o I 処理後のDNA鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

(4) PCRマーカーP 4 1 0 3 0 T a q I の開発

実施例2で明らかにしたI R 2 4 コンティグに対応するゲノム塩基配列（配列番号27）とあそみのりコンティグに対応するゲノム塩基配列（配列番号28）とを比較した結果、配列番号27の45461番目の塩基がAであるのに対し、当該位置に対応する配列番号28の49164番目の塩基はGであることを見出した。

この差異の検出には、先ず次のプライマー対：

10 P 4 1 0 3 0 T a q I F :

5' -aagaaggagggttatagaatctg- 3' (配列番号45)

(配列番号27の塩基45369-45392に相当)

(配列番号28の塩基49072-49095に相当)

および

15 P 4 1 0 3 0 T a q I R :

5' -atatcaggactaacaccactgctc- 3' (配列番号46)

(配列番号27の塩基45648-45625に相当)

(配列番号28の塩基49351-49328に相当)

を用いて当該部位周辺のPCR増幅を行い280bpの断片を増幅する。増幅産物をT a q I 処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、I R 2 4 DNAからの増幅産物はT a q I の認識配列（TCGA）をもたず、T a q I 処理により切断されないのに対し、あそみのりDNAからの増幅産物はT a q I の認識配列をもち、T a q I 処理により切断されるため、T a q I 処理後のDNA鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

(5) PCRマーカーP 4 5 1 7 7 B s t U I の開発

実施例2で明らかにしたI R 2 4 コンティグに対応するゲノム塩基配列（配列番号27）とあそみのりコンティグに対応するゲノム塩基配列（配列番号28）とを比較した結果、配列番号27の49609番目の塩基がAであるのに対し、

当該位置に対応する配列番号 28 の 5 3 3 1 1 番目の塩基は G であることを見出した。

この差異の検出には、先ず次のプライマー対：

P 4 5 1 7 7 B s t U I F :

5 5' -acgagtagtagcgatcttccagcg- 3' (配列番号 47)

(配列番号 27 の塩基 4 9 3 5 5 - 4 9 3 7 8 に相当)

(配列番号 28 の塩基 5 3 0 5 7 - 5 3 0 8 0 に相当)

および

P 4 5 1 7 7 B s t U I R :

10 5' -cagcgtgaaactaaaaacggagcg- 3' (配列番号 48)

(配列番号 27 の塩基 5 0 1 6 6 - 5 0 1 4 3 に相当)

(配列番号 28 の塩基 5 3 8 6 8 - 5 3 8 4 5 に相当)

を用いて当該部位周辺の PCR 増幅を行い 8 1 2 b p の断片を増幅する。増幅産物を B s t U I 処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、I R 2 4 DNA からの増幅産物は B s t U I の認識配列 (C G C G) を 2 個所もち、B s t U I 処理により 3 個の断片に切断されるのに対し、あそみのり DNA からの増幅産物は B s t U I の認識配列を 3 個所もち、B s t U I 処理により 4 個の断片に切断されるため、B s t U I 処理後の DNA 鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

(6) PCR マーカー B 6 0 3 0 4 M s p I の開発

実施例 2 で明らかにした I R 2 4 コンティグに対応するゲノム塩基配列 (配列番号 27) と既述の B A C クローン (アクセッション番号 A C 0 6 8 9 2 3) の塩基配列とを比較した結果、配列番号 27 の 5 6 3 6 8 番目の塩基が T であるの
25 に対し、当該位置に対応する A C 0 6 8 9 2 3 の塩基は C であることを見出した。

この差異の検出は、先ず次のプライマー対：

B 6 0 3 0 4 M s p I F :

5' -atcccacatcatcataatccgacc- 3' (配列番号 49)

(配列番号 27 の塩基 56149-56172 に相当)

および

B60304 MspI R:

5' -agcttctcccttgatacgggtggcg-3' (配列番号 50)

5 (配列番号 27 の塩基 56479-56455 に相当)

を用いて当該部位周辺の PCR 増幅を行い約 330 bp の断片を増幅する。増幅産物を MspI 処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、IR24 DNA からの増幅産物は MspI の認識配列 (CCGG) をもたず、MspI 処理により切断されないのに対し、日本晴 DNA からの増幅産物は MspI の認識配列をもち、MspI 処理により切断されるため、MspI 処理後の DNA 鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

なお、本マーカーの開発には、dCAPS 法を適用した。具体的には、B60304 MspI Rプライマーの使用により、配列番号 27 の 56463 の g が t に置換される。これにより、配列番号 27 の 56460-56463 の MspI の認識配列 CCGG が ccgt となり、MspI によって切断されなくなる。よって、IR24 由来の断片は MspI の認識配列を一つも有さず、一方、日本晴由来の DNA は、配列番号 27 の 56367-56370 に対応する領域に 1箇所 MspI の認識配列を有することとなる。

20 (7) PCR マーカー B59066 BsaJI の開発

実施例 2 で明らかにした IR24 コンティグに対応するゲノム塩基配列 (配列番号 27) と既述の BAC クローン (アクセッション番号 AC068923) の塩基配列とを比較した結果、配列番号 27 の 57629 番目の塩基が C であるのに対し、当該位置に対応する AC068923 の塩基は CC であることを見出した。

この差異の検出は、まず次のプライマー対:

B59066 BsaJI F:

5' -atttggttggttagttgcggctgag-3' (配列番号 51)

(配列番号 27 の塩基 57563-57586 に相当)

および

B 5 9 0 6 6 B s a J I R :

5' - gcccactcaaaaggagagaacc - 3' (配列番号 5 2)

(配列番号 2 7 の塩基 5 7 9 8 3 - 5 7 9 6 0 に相当)

- 5 を用いて当該部位周辺の P C R 増幅を行い約 4 2 0 b p の断片を増幅する。増幅産物を B s a J I 処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、I R 2 4 DNA からの増幅産物は B s a J I の認識配列 (C C N N G G) をもたず、B s a J I 処理により切断されないのに対し、日本晴 DNA からの増幅産物は B s a J I の認識配列をもち、B s a J I 処理により切断されるため、B s a J I 処理後の DNA 鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

(8) P C R マーカー B 5 6 6 9 1 X b a I の開発

- 実施例 2 で明らかにした I R 2 4 コンティグに対応するゲノム塩基配列 (配列番号 2 7) と既述の B A C クローン (アクセッション番号 A C 0 6 8 9 2 3) の塩基配列とを比較した結果、配列番号 2 7 の 6 6 2 6 7 番目の塩基が G であるの
15 に対し、当該位置に対応する A C 0 6 8 9 2 3 の塩基は C であることを見出した。

この差異の検出は、先ず次のプライマー対 :

B 5 6 6 9 1 X b a I F :

- 20 5' - cctcaagtctccccctaaagccact - 3' (配列番号 5 3)

(配列番号 2 7 の塩基 6 6 1 2 9 - 6 6 1 5 2 に相当)

および

B 5 6 6 9 1 X b a I R :

5' - gctctactgctgataaaccgtgag - 3' (配列番号 5 4)

- 25 (配列番号 2 7 の塩基 6 6 7 9 9 - 6 6 7 7 6 に相当)

を用いて当該部位周辺の P C R 増幅を行い約 6 7 0 b p の断片を増幅する。増幅産物を X b a I 処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、I R 2 4 DNA からの増幅産物は X b a I の認識配列 (T C T A G A) をもたず、X b a I 処理により切断されないのに対し、日本晴

DNAからの増幅産物はXbaIの認識配列をもち、XbaI処理により切断されるため、XbaI処理後のDNA鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

(9) PCRマーカーB53627 BstZ17Iの開発

- 5 実施例2で明らかにしたIR24コンティグに対応するゲノム塩基配列（配列番号27）と既述のBACクローン（アクセッション番号AC068923）の塩基配列とを比較した結果、配列番号27の69331番目の塩基がTであるのに対し、当該位置に対応するAC068923の塩基はCであることを見出した。

- 10 この差異の検出は、先ず次のプライマー対：

B53627 BstZ17I F：

5' -tggtatggactatgtgggggtcagtc-3' (配列番号55)

(配列番号27の塩基68965-68988に相当)

および

- 15 B53627 BstZ17I R：

5' -agtgggaagtggagagagtagggag-3' (配列番号56)

(配列番号27の塩基69582-69559に相当)

を用いて当該部位周辺のPCR増幅を行い約620bpの断片を増幅する。

増幅産物をBstZ17I処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、

- 20 可視化することができる。すなわち、IR24DNAからの増幅産物はBstZ17Iの認識配列(GTATAC)をもち、XbaI処理により切断されるのに対し、日本晴DNAからの増幅産物はBstZ17Iの認識配列をもたず、BstZ17I処理により切断されないため、BstZ17I処理後のDNA鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

- 25 (10) PCRマーカーB40936 MseIの開発

以下の(10)-(12)のPCRマーカーの開発はいずれも、配列番号27の3'末端76363よりもさらに下流(3'末端)側に相当する塩基配列についての研究に関する。

既述のBACクローン（アクセッション番号AC068923）の塩基配列に対して、次のプライマー対：

5' - tacgacgccatttcactccattgc - 3' （配列番号57）

および

5' - catttctctatgggcgttgctctg - 3' （配列番号58）

を設計した。このプライマー対を用いて、MS-FRコシヒカリ（Rf-1座の遺伝子型はRf-1 Rf-1）およびコシヒカリのトータルDNAをテンプレートに、定法に従いPCRを行った。得られた約1300bpの増幅産物を、アガロースゲルでの電気泳動後、QIAEXII（QIAGEN社）を用いて精製した。精製したDNAの塩基配列を、DNAシーケンサー377（ABI社）により解析した結果、数箇所において多型を見出すことができた。

そのひとつは、次のプライマー対：

B40936 MseI F：

5' - acctgtaggtatggcaccttcaacac - 3' （配列番号59）

および

B40936 MseI R：

5' - ccaaggaacgaagttcaaagtgtatgg - 3' （配列番号60）

を用いて当該部位周辺のPCR増幅を行い、増幅産物をMseI処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、MS-FRコシヒカリ（Rf-1 Rf-1）DNAからの増幅産物はMseIの認識配列（TTAA）をもち、MseI処理により切断されるのに対し、コシヒカリDNAからの増幅産物はMseIの認識配列をもたず、MseI処理により切断されないため、MseI処理後のDNA鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

なお、本マーカーの開発には、dCAPS法を適用した。

（11）PCRマーカーB19839 MwoIの開発

既述のBACクローン（アクセッション番号AC068923）の塩基配列に対して、次のプライマー対：

5' - tgatgtgtttgggcatccctttcg - 3' （配列番号61）

および

5' -gagataggggacgacagacacgac- 3' (配列番号 6 2)

を設計した。このプライマー対を用いて、MS-FR コシヒカリ (Rf-1 Rf-1) およびコシヒカリのトータルDNAをテンプレートに、定法に従いPCRを行なった。得られた約1200bpの増幅産物を、アガロースゲルでの電気泳動後、QIAEXII (QIAGEN社) を用いて精製した。精製したDNAの塩基配列を、DNAシーケンサー377 (ABI社) により解析した結果、数箇所において多型を見出すことができた。

そのひとつは、次のプライマー対:

10 B19839 MwoI F:

5' -tcctatggctgttttagaaactgcaca- 3' (配列番号 6 3)

および

B19839 MwoI R:

5' -caagttcaaacataactggcggttg- 3' (配列番号 6 4)

15 を用いて当該部位周辺のPCR増幅を行い、増幅産物をMwoI処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、MS-FR コシヒカリ (Rf-1 Rf-1) DNAからの増幅産物はMwoIの認識配列 (GCNNNNNNNGC) をもたず、MwoI処理により切断されないのに対し、コシヒカリDNAからの増幅産物はMwoIの認識配列をもち、MwoI処理により切断されるため、MwoI処理後のDNA鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

なお、本マーカーの開発には、dCAPS法を適用した。

(12) PCRマーカーB2387 BfaIの開発

既述のBACクローン (アクセッション番号AC068923) の塩基配列に

25 対して、次のプライマー対:

5' -cactgtcctgtaagtgtgctgtgc- 3' (配列番号 6 5)

および

5' -caagcgtgtgataaaatgtgacgc- 3' (配列番号 6 6)

を設計した。このプライマー対を用いて、MS-FRコシヒカリ (R f - 1 R f - 1) およびコシヒカリのトータルDNAをテンプレートに、定法に従いPCRを行った。得られた約1300bpの増幅産物を、アガロースゲルでの電気泳動後、QIAEXII (QIAGEN社) を用いて精製した。精製したDNAの塩基配列を、DNAシーケンサー377 (ABI社) により解析した結果、数個所において多型を見出すことができた。

そのひとつは、次のプライマー対：

B2387 B f a I F：

5' - tgcctactgccattactatgtgac - 3' (配列番号67)

10 および

B2387 B f a I R：

5' - acatactaccgtaaattggtctctg - 3' (配列番号68)

を用いて当該部位周辺のPCR増幅を行い、増幅産物をB f a I処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、MS-FRコシヒカリ (R f - 1 R f - 1) DNAからの増幅産物はB f a Iの認識配列 (CTAG) をもたず、B f a I処理により切断されないのに対し、コシヒカリDNAからの増幅産物はB f a Iの認識配列をもち、B f a I処理により切断されるため、B f a I処理後のDNA鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

20 (13) 分離分析

実施例1で得られた、R f - 1座とS12564 T s p 5 0 9 I座との間での組換え個体2個体 (RS1およびRS2) およびR f - 1座とC1361 M w o I座との間での組換え個体8個体 (RC1からRC8) について、上記

(1) ないし (12) で開発した12個のDNAマーカー座の遺伝子型を調査した。結果を、各個体のS12564 T s p 5 0 9 I座およびC1361 M w o I座の遺伝子型とともに表4に示した。

表 4 Rf-1 座極近傍組換え個体のマーカー座遺伝子型

| Locus | RS1 | RS2 | RC1 | RC2 | RC3 | RC4 | RC5 | RC6 | RC7 | RC8 |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| S12564 Tsp509I | J | J | H | H | H | H | H | H | H | H |
| P4497 MboI | J | J | H | H | H | H | H | H | H | H |
| P9493 BstI | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| P23945 MboI | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| P41030 TaqI | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| P45177 BstUI | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| B60304 MspI | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| B59066 BsaJI | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| B56691 XbaI | H | H | H | H | H | H | H | J | H | H |
| B53627 BstZ17I | H | H | H | H | H | H | H | J | H | H |
| B40936 MseI | H | H | H | H | H | H | H | J | H | H |
| B19839 MwoI | H | H | H | H | H | J | H | J | H | H |
| B2387 BfaI | H | H | H | H | H | J | H | J | H | J |
| C1361 MwoI | H | H | J | J | J | J | J | J | J | J |

J コシヒカリ型ホモ

H コシヒカリ型/MS-FRコシヒカリ型ヘテロ

表 4 は、いずれの個体も P 9 4 9 3 B s l I ないし 5 9 0 6 6 B s a J I の間については、インディカ型品種由来の R f - 1 染色体領域を有することを示す。この結果から、図 3 で示したような染色体構成をもつ組換え型花粉において、花粉の受精能力があること、すなわち、R f - 1 遺伝子が機能していることが示された。これは、これらの組換え型花粉が共有するインディカ型領域、すなわち、最大限に見積もっても P 4 4 9 7 M b o I 座から B 5 6 6 9 1 X b a I 座までの領域（約 6 5 k b）に、R f - 1 遺伝子の機能の有無を決定する配列が含まれることを意味する。

ただし、R f - 1 遺伝子の一部の遺伝子型がインディカ型であることが、R f - 1 遺伝子の遺伝子機能発現に重要であり、残りの部分はジャポニカ型でもインディカ型でも遺伝子機能に大きな差異を生じない可能性がある。よって、上記共有インディカ型領域（配列番号 27 の塩基 1 2 3 9 ないし 6 6 2 6 7）が R f - 1 遺伝子全体を完全に包含するとは、断定できない。しかしながら、以下の理由、

- 1) 遺伝子の大きさは通常数 k b であり 1 0 k b を超えることは稀である；
- 2) 本発明で明らかにした I R 2 4 のゲノム塩基配列（配列番号 27）は、上記共有インディカ型領域を完全に包含する；
- 3) 配列番号 27 の 5' 末端は、上記共有インディカ型領域の 5' 末端から 1 2 3 8 b p 上流に位置し、別の遺伝子（S 1 2 5 6 4）の一部である；および

4) 配列番号27の3'末端は、上記共有インディカ型領域の3'末端から10096bp下流に位置する
により、少なくとも配列番号27はRf-1遺伝子全体を完全に包含すると考えられる。

5 実施例4 XSE1由来の9.7kb断片に関する相補性試験

(材料および方法)

λファージクローンXSE1 (図1および5) をNotIで完全消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された9.7kbの断片 (配列番号27の塩基1-9657を含む) を、QIAEXII (QIAGEN社) を用いて
10 精製した。

一方、pSB11 (Komariら、上述) を基に、ハイグロマイシン耐性遺伝子カセットを持つ中間ベクターpSB200を作成した。具体的には、まず、ユビキチンプロモーターとユビキチンイントロン (Pubi-ubiI) に、ノパリン合成酵素のターミネーター (Tnos) を接続した。これより得られたPubi-ubiI-Tnos接続体のubiI-Tnos間に、ハイグロマイシン体制遺伝子 (HYG (R)) を挿入することにより、Pubi-ubiI-HYG (R) -Tnosからなる接続体を得た。この接続体を、pSB11のHindIII/EcoRI断片に接続することにより、pKY205を得た。この
15 pKY205のPubi上流に存在するHindIII部位にNotI、NspV、EcoRV、KpnI、SacI、EcoRIの制限酵素部位を追加するためのリンカー部位を挿入することにより、ハイグロマイシン耐性遺伝子カセットを有するpSB200を得た。
20

上記プラスミドベクターpSB200をNotIで完全消化後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAをTE溶液に溶解後、CIAP (TAKARA社) により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII (QIAGEN社) を用いてゲルからベクター断片を精製した。
25

上記により準備した、XSE1由来の9.7kb断片とベクター断片の二つの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1 (TAKA

RA社)を用いてライゲーション反応を行った。反応後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAを純水(Millipore社製装置により作成)に溶解後、大腸菌DH5 α と混合し、エレクトロポレーションに供試した。エレクトロポレーション後の溶液を、LB培地で振盪培養(37°C、1時間)した後、スペクチノマイシンを含むLBプレートに広げ、加温(37°C、16時間)した。生じたコロニーのなかの24個についてプラスミドを単離した。その制限酵素断片長パターンおよび境界部塩基配列を調査することにより、組換えプラスミドにより形質転換された所望の大腸菌を選抜した。

上記により選抜した大腸菌を、*Agrobacterium tumefaciens* 菌株LB4404/pSB1(Komari et al, 1996)およびヘルパー大腸菌HB101/pRK2013(Ditta et al, 1980)とともに供試して、Ditta et al(1980)の方法に従い、三菌系交雑(triparential mating)を行った。スペクチノマイシンを含むABプレートに生じたコロニーのなかの6個について、プラスミドを単離し、制限酵素断片長パターンを調査することにより、所望のアグロバクテリウムを選抜した。

上記により選抜したアグロバクテリウムを用いて、Hiei et al(1994)の方法に準拠し、MSコシヒカリ(BT細胞質を持ち、核遺伝子はコシヒカリとほぼ同一)の形質転換を行った。形質転換に必要なMSコシヒカリの未熟種子は、MSコシヒカリにコシヒカリの花粉をかけることにより作成した。

形質転換植物は、馴化後、長日条件の温室に移した。移植適期まで育成した後、48個体の植物を、1/5000アールのワグネルポットに移植し(4個体/ポット)、移植3~4週間後に短日条件の温室に移した。出穂約1か月後に、種子稔性を立毛調査した。

(結果および考察)

形質転換植物48個体は、いずれも不稔であった。このことから、導入した9.7kb断片は、少なくとも完全長のRf-1遺伝子を包含していないと考えられた。

実施例5 XSE7由来の14.7kb断片に関する相補性試験

(材料および方法)

λファージクローンXSE7 (図1および5) をEcoRIで完全消化後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAをTE溶液に溶解後、DNA Blunting Kit (TAKARA社) により平滑化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけ、分離された14.7kbの断片 (配列番号27の塩基2618-17261を含む) を、QIAEXII (QIAGEN社) を用いて精製した。

一方、プラスミドベクターpSB200をSacIで完全消化後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAをTE溶液に溶解後、CIAP (TAKARA社) により脱リン酸化し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAをTE溶液に溶解後、DNA Blunting Kit (TAKARA社) により平滑化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII (QIAGEN社) を用いてゲルからベクター断片を精製した。

上記により準備した、XSE7由来の14.7kb断片とベクター断片の二つの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1 (TAKARA社) を用いてライゲーション反応を行った。以後、実施例4に記載の方法に準拠して、形質転換植物を作成・調査した。

(結果および考察)

形質転換植物48個体は、いずれも不稔であった。このことから、導入した14.7kb断片は、少なくとも完全長のRf-1遺伝子を包含していないと考えられた。

実施例6 XSF4由来の21.3kb断片に関する相補性試験

(材料および方法)

λファージクローンXSF4 (図1および5) をNotIで部分消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された21.3kbの断片 (配列番号27の塩基12478-33750を含む) を、QIAEXII (QIAGEN社) を用いて精製した。

一方、プラスミドベクター pSB200 を Not I で完全消化後、エタノール沈殿により DNA を回収した。回収した DNA を TE 溶液に溶解後、CIAP (TAKARA 社) により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII (QIAGEN 社) を用いてゲルからベクター断片を精製した。

上記により準備した、XSF4 由来の 21.3 kb の断片とベクター断片の二つの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1 (TAKARA 社) を用いてライゲーション反応を行った。以後、実施例 4 に記載の方法に準拠して、形質転換植物を作成・調査した。

(結果および考察)

形質転換植物 48 個体は、いずれも不稔であった。このことから、導入した 21.3 kb 断片は、少なくとも完全長の Rf-1 遺伝子を包含していないと考えられた。

実施例 7 XSF20 由来の 13.2 kb 断片に関する相補性試験

(材料および方法)

λファージクローン XSF20 (図 1 及び 5) を Sal I で完全消化後、エタノール沈殿により DNA を回収した。回収した DNA を TE 溶液に溶解後、DNA Blunting Kit (TAKARA 社) により平滑化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけ、分離された 13.2 kb の断片 (配列番号 2 の塩基 26809-40055 を含む) を、QIAEXII (QIAGEN 社) を用いて精製した。

一方、プラスミドベクター pSB200 を EcoRV で完全消化後、エタノール沈殿により DNA を回収した。回収した DNA を TE 溶液に溶解後、CIAP (TAKARA 社) により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII (QIAGEN 社) を用いてゲルからベクター断片を精製した。

上記により準備した、XSF20 由来の 13.2 kb の断片とベクター断片の二つの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1 (T

AKARA社)を用いてライゲーション反応を行った。以後、実施例4に記載の方法に準拠して、形質転換植物を作成・調査した。

(結果および考察)

5 形質転換植物44個体は、いずれも不稔であった。このことから、導入した13.2kb断片は、少なくとも完全長のRf-1遺伝子を包含していないと考えられた。

実施例8 XSF18由来の16.2kb断片に関する相補性試験

(材料および方法)

10 λファージクローンXSF18はXSF20と5'末端及び3'末端(各々、配列番号27の塩基20328及び41921)と同一だが、途中の塩基33947-38591を欠いている。よって、配列番号27の塩基20328-33946及び38592-41921を含む。これは、最初にクローンXSF18が単離されたが、単離後の増殖の過程で上記欠失を生じたことが判明したため、再度増殖をやり直すことにより、完全型のクローンを単離し、XSF20と命名したことに因る。

λファージクローンXSF18(図5)をNotIで完全消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された16.2kbの断片(配列番号27の塩基21065-33946及び38592-41921を含む)を、QIAEXII(QIAGEN社)を用いて精製した。

20 一方、プラスミドベクターpSB200をNotIで完全消化後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAをTE溶液に溶解後、CIAP(TAKARA社)により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII(QIAGEN社)を用いてゲルからベクター断片を精製した。

25 上記により準備した、XSF18由来の16.2kbの断片とベクター断片の二つの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1(TAKARA社)を用いてライゲーション反応を行った。以後、実施例4に記載の方法に準拠して、形質転換植物を作成・調査した。

(結果および考察)

形質転換植物48個体は、いずれも不稔であった(図6)。このことから、導入した16.2kb断片は、少なくとも完全長のRf-1遺伝子を包含していないと考えられた。

実施例9 XSG22由来の12.6kb断片に関する相補性試験

5 (材料および方法)

λファージクローンXSG22(図1および5)をNotIで部分消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された12.6kbの断片(配列番号27の塩基31684-44109を含む)を、QIAEXII(QIAGEN社)を用いて精製した。

10 一方、プラスミドベクターpSB200をNotIで完全消化後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAをTE溶液に溶解後、CIAP(TAKARA社)により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII(QIAGEN社)を用いてゲルからベクター断片を精製した。

15 上記により準備した、XSG22由来の12.6kbの断片とベクター断片の二つの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1(TAKARA社)を用いてライゲーション反応を行った。以後、実施例4に記載の方法に準拠して、形質転換植物を作成・調査した。

(結果および考察)

20 形質転換植物48個体は、いずれも不稔であった。このことから、導入した12.6kb断片は、少なくとも完全長のRf-1遺伝子を包含していないと考えられた。

実施例10 XSG16由来の15.7kb断片に関する相補性試験

(1)

25 (材料および方法)

λファージクローンXSG16(図1および5)をNotIで部分消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された15.7kbの断片(配列番号27の塩基38538-54123を含む)を、QIAEXII(QIAGEN社)を用いて精製した。

一方、プラスミドベクター pSB200 を Not I で完全消化後、エタノール沈殿により DNA を回収した。回収した DNA を TE 溶液に溶解後、CIAP (TAKARA 社) により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII (QIAGEN 社) を用いてゲルからベクター断片を精製した。

上記により準備した、XSG16 由来の 15.7 kb 断片とベクター断片の二つの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1 (TAKARA 社) を用いてライゲーション反応を行った。以後、実施例 4 に記載の方法に準拠して、形質転換植物を作成・調査した。

(結果および考察)

形質転換植物 47 個体のうち、少なくとも 37 個体は、明らかに稔性を回復していた (図 6)。このことから、導入した 15.7 kb 断片のなかのイネ (IR24) に由来する部分である 15586 塩基 (配列番号 27 の塩基 38538-54123) が、完全長の Rf-1 遺伝子を包含していると考えられた。

(2) XSG16 内部の 11.4 kb 断片に関する相補性試験

(材料および方法)

λファージクローン XSG16 を AlwNI および BsiWI で完全消化後、エタノール沈殿により DNA を回収した。回収した DNA を TE 溶液に溶解後、DNA Blunting Kit (TAKARA 社) により平滑化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけ、分離された 11.4 kb の断片を、QIAEXII (QIAGEN 社) を用いて精製した。

プラスミドベクター pSB11 (Komari et al. Plant Journal, 1996) を SmaI で完全消化後、エタノール沈殿により DNA を回収した。回収した DNA を TE 溶液に溶解後、CIAP (TAKARA 社) により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII (QIAGEN 社) を用いてゲルからベクター断片を精製した。

上記により準備したふたつの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1 (TAKARA 社) を用いてライゲーション反応を行った。

反応後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAを純水（Millipore社製装置により作成）に溶解後、大腸菌DH5 α と混合し、エレクトロポレーションに供試した。エレクトロポレーション後の溶液を、LB培地で振とう培養（37°C、1時間）した後、スペクチノマイシンを含むLBプレートに広げ、加温（37°C、16時間）した。生じたコロニーのなかの14個について、プラスミドを単離し、制限酵素断片長パターンおよび境界部塩基配列を調査することにより、所望の大腸菌を選抜した。

上記により選抜した大腸菌を、*Agrobacterium tumefaciens* 菌株LBA4404/pSB4U（高倉ら、特願2001-269982（WO02/019803 A1））およびヘルパー大腸菌HB101/pRK2013（Ditta et al, 1980）とともに供試して、Ditta et al（1980）の方法に従い、三菌系交雑（triparential mating）を行った。スペクチノマイシンを含むABプレートに生じたコロニーのなかの12個について、プラスミドを単離し、制限酵素断片長パターンを調査することにより、所望のアグロバクテリウムを選抜した。

上記により選抜したアグロバクテリウムを用いて、Hiei et al（1994）の方法に準拠し、MSコシヒカリ（BT細胞質を持ち、核遺伝子はコシヒカリとほぼ同一）の形質転換を行った。形質転換に必要なMSコシヒカリの未熟種子は、MSコシヒカリにコシヒカリの花粉をかけることにより作成した。

形質転換植物は、馴化後、長日条件の温室に移した。移植適期まで育成した後、120個体の植物を、1/5000アールのワグネルポットに移植し（4個体/ポット）、移植約1か月後に短日条件の温室に移した。出穂約1か月後に、各個体から標準的な穂を1穂サンプリングし、種子稔性（総もみ数に対する稔実もみの割合）を調査した。

（結果および考察）

形質転換植物120個体のうち、59個体が10%以上の種子稔性を示し、そのうち19個体は70%以上の種子稔性を示した。このことから、導入した1.4 kb断片（配列番号27の42357番目の塩基から53743番目の塩

基まで)が、稔性回復の機能を発現するうえで必須のRf-1遺伝子領域を包含していると考えられた。

(3) XSG16内部の6.8kb断片に関する相補性試験

(材料および方法)

- 5 λファージクローンXSG16をHpaIおよびAlwNIで完全消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された6.8kbの断片を、QIAEXII (QIAGEN社)を用いて精製した。
- プラスミドベクターpSB11の調整を含め、以後の過程は上記(2)に記載の方法に準拠した。

10 (結果および考察)

形質転換植物120個体のうち、67個体が10%以上の種子稔性を示し、そのうち26個体は70%以上の種子稔性を示した。このことから、導入した6.8kb断片(配列番号27の42132番目の塩基から48883番目の塩基まで)が、稔性回復の機能を発現するうえで必須のRf-1遺伝子領域を包含して

15 いると考えられた。

実施例11 XSG8由来の16.9kb断片に関する相補性試験

(材料および方法)

- λファージクローンXSG8(図1および5)をNotIで完全消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された16.9kbの断片(配列番号
- 20 27の塩基46558-63364を含む)を、QIAEXII (QIAGEN社)を用いて精製した。

- 一方、プラスミドベクターpSB200をNotIで完全消化後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAをTE溶液に溶解後、CIAP (TAKARA社)により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気
- 25 泳動にかけた後、QIAEXII (QIAGEN社)を用いてゲルからベクター断片を精製した。

上記により準備した、XSG8由来の16.9kb断片とベクター断片の二つの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1 (TAK

ARA社)を用いてライゲーション反応を行った。以後、実施例4に記載の方法に準拠して、形質転換植物を作成・調査した。

(結果および考察)

形質転換植物48個体は、いずれも不稔であった。このことから、導入した16.9 kb断片は、少なくとも完全長のRf-1遺伝子を包含していないと考えられた。

実施例12 XSH18由来の20.0 kb断片に関する相補性試験

(材料および方法)

λファージクローンXSH18(図1および5)をNotIで完全消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された20.0 kbの断片(配列番号27の塩基56409-76363を含む)を、QIAEXII(QIAGEN社)を用いて精製した。

一方、プラスミドベクターpSB200をNotIで完全消化後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAをTE溶液に溶解後、CIAP(TAKARA社)により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII(QIAGEN社)を用いてゲルからベクター断片を精製した。

上記により準備した、XSH18由来の20.0 kbの断片とベクター断片の二つの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1(TAKARA社)を用いてライゲーション反応を行った。以後、実施例4に記載の方法に準拠して、形質転換植物を作成・調査した。

(結果および考察)

形質転換植物44個体は、いずれも不稔であった。このことから、導入した20.0 kb断片は、少なくとも完全長のRf-1遺伝子を包含していないと考えられた。

実施例13 XSG8およびXSH18の重複部由来の19.7 kb断片に関する相補性試験

(材料および方法)

実施例 11 におけるライゲーションによって得られた所望の大腸菌から単離したプラスミド (XSG8SB200F) を、SalI および StuI で完全消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された 12.8 kb の断片 (配列番号 27 の塩基 50430-63197 を含む) を、QIAEXII (Q
5 IAGEN 社) を用いて精製した。

一方、実施例 12 におけるライゲーションによって得られた所望の大腸菌から単離したプラスミド (XSH18SB200R) を、SalI、StuI および XhoI で完全消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された
10 6.9 kb 断片 (配列番号 27 の塩基 63194-70116 を含む) を、QIAEXII (QIAGEN 社) を用いて精製した。

さらに、プラスミドベクター pSB200 を EcoRV で完全消化後、エタノール沈殿により DNA を回収した。回収した DNA を TE 溶液に溶解後、CIAP (TAKARA 社) により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII (QIAGEN 社) を用いてゲルからベクタ
15 ー断片を精製した。

上記により準備した、XSG8 由来の 12.8 kb の断片、XSH18 由来の 6.9 kb の断片、及びベクター断片の三個の断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1 (TAKARA 社) を用いてライゲーション反応を行った。ライゲーション産物は、XSG8 および XSH18 の重複部由来
20 の 19.7 kb 断片 (配列番号 27 の 50430-70116 を含む) (図 5 の XSX1) を含む。以後、実施例 4 に記載の方法に準拠して、形質転換植物を作成・調査した。

(結果および考察)

形質転換植物 40 個体は、いずれも不稔であった。このことから、導入した 1
25 9.7 kb 断片は、少なくとも完全長の Rf-1 遺伝子を包含していないと考えられた。

請求の範囲

1. 配列番号 27 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基配列と
5 少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸をイネに
導入することにより、イネの稔性を回復する方法。
2. 配列番号 27 の塩基 38538-54123 の塩基配列を有する核酸、
又は配列番号 27 の塩基 38538-54123 の塩基配列と少なくとも 70%
10 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸をイネに導入することによ
り、イネの稔性を回復する方法。
3. 配列番号 27 の塩基 42132-48883 の塩基配列を有する核酸、
又は配列番号 27 の塩基 42132-48883 の塩基配列と少なくとも 70%
同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸をイネに導入することによ
り、イネの稔性を回復する方法。
- 15 4. 配列番号 27 の塩基配列又は配列番号 27 の塩基 38538-5412
3 の塩基配列と、少なくとも 70% 同一の塩基配列が、以下の条件 1) 及び 2)
の少なくとも一つを満たす、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法：
1) 配列番号 27 の塩基 45461 に相当する塩基が A である；及び
2) 配列番号 27 の塩基 49609 に相当する塩基が A である。
- 20 5. イネに導入される稔性回復遺伝子座を含む核酸が、稔性回復遺伝子以外
の構造遺伝子を含まない、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の方法。
6. 稔性回復遺伝子 (Rf-1 遺伝子) の機能の有無を決定する配列がイネ
第 10 染色体上の多型検出用マーカー座 P4497 Mb o I と B56691
Xba I の間に存在することを利用して、被検定イネ個体又は種子が Rf-1 遺
25 伝子を有するか否かを識別する方法。
7. 稔性回復遺伝子が、配列番号 27 の塩基配列からなる核酸、又は配列番
号 27 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列からなる核酸中に存在す
る、請求項 6 に記載の方法。

8. 稔性回復遺伝子が、配列番号27の塩基38538-54123の塩基配列を有する核酸、又は配列番号27の塩基38538-54123の塩基配列と少なくとも70%同一の塩基配列からなる核酸中に存在する、請求項6に記載の方法。

5 9. 稔性回復遺伝子が、配列番号27の塩基42132-48883の塩基配列を有する核酸、又は配列番号27の塩基42132-48883の塩基配列と少なくとも70%同一の塩基配列からなる核酸中に存在する、請求項6に記載の方法。

10 10. 配列番号27の塩基配列又は配列番号27の塩基38538-54123の塩基配列と、少なくとも70%同一の塩基配列が、以下の条件1)及び2)の少なくとも一つを満たす場合に被検定イネ個体又は種子がRf-1遺伝子を有すると判断する、請求項7ないし9のいずれか1項に記載の方法：

- 1) 配列番号27の塩基45461に相当する塩基がAである；及び
- 2) 配列番号27の塩基49609に相当する塩基がAである。

15 11.

i) 以下のいずれかの塩基、

- 1) 配列番号27の塩基45461に相当する塩基；又は
- 2) 配列番号27の塩基49609に相当する塩基；

20 を含む隣接領域の塩基配列に基づいて、上記塩基と隣接領域の双方を増幅するようにプライマー対を作成し；

i i) 被検定イネ個体又は種子のゲノムDNAを鋳型として核酸増幅反応を行い；そして

25 i i i) 前記核酸増幅産物に見出される多型に基づいて被検定イネ個体又は種子がRf-1遺伝子の有無を識別する、請求項7ないし10のいずれか1項に記載の方法。

12. 工程i i i) が、以下の条件1)及び2)の少なくとも一つを満たす場合に被検定イネ個体又は種子がRf-1遺伝子を有すると判断する、請求項11に記載の方法：

1) 配列番号 27 の塩基 4 5 4 6 1 に相当する塩基を含む領域が、T a q I 認識配列を有しない；及び

2) 配列番号 27 の塩基 4 9 6 0 9 に相当する塩基を含む領域が、B s t U I 認識配列を有しない。

5 13. 配列番号 4 5 及び 4 6、並びに、配列番号 4 7 及び 4 8 からなるグループから選択される塩基配列を有するプライマー対を使用する、請求項 11 又は 12 に記載の方法。

10 14. 配列番号 27 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸、に対し相補的な塩基配列から選択される、連続した少なくとも 100 塩基の長さのアンチセンスを導入することにより、R f - 1 遺伝子の稔性回復機能を抑制する方法。

15 15. 配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸、に対し相補的な塩基配列から選択される、連続した少なくとも 100 塩基の長さのアンチセンスを導入することにより、R f - 1 遺伝子の稔性回復機能を抑制する方法。

16. 配列番号 27 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸。

20 17. 配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸。

25 18. 配列番号 27 の塩基 4 2 1 3 2 - 4 8 8 8 3 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 4 2 1 3 2 - 4 8 8 8 3 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸。

☒ 1

RFLP Probe (S12564)

☐

Probe A ■ Probe E ■ Probe F ■ Probe G ■ Probe H ■

WSA 1 _____

WSA 3 _____

WSE 8 _____

WSF 5 _____

WSF 7 _____

WSG 6 _____

WSG 2 _____

(1) あそみのり

XSE 1 _____ 12481

XSE 7 _____ 2618 17261

XSF 4 _____ 12478 33750

XSF 20 _____ 20328 41921

XSG 22 _____ 31684 48847

XSG 16 _____ 38538 54123

XSO 8 _____ 46538 63364

XSH 18 _____ 56409 76363

(2) IR24

図 2

あそみのリコンティグ



IR24コンティグ



AC068923

3

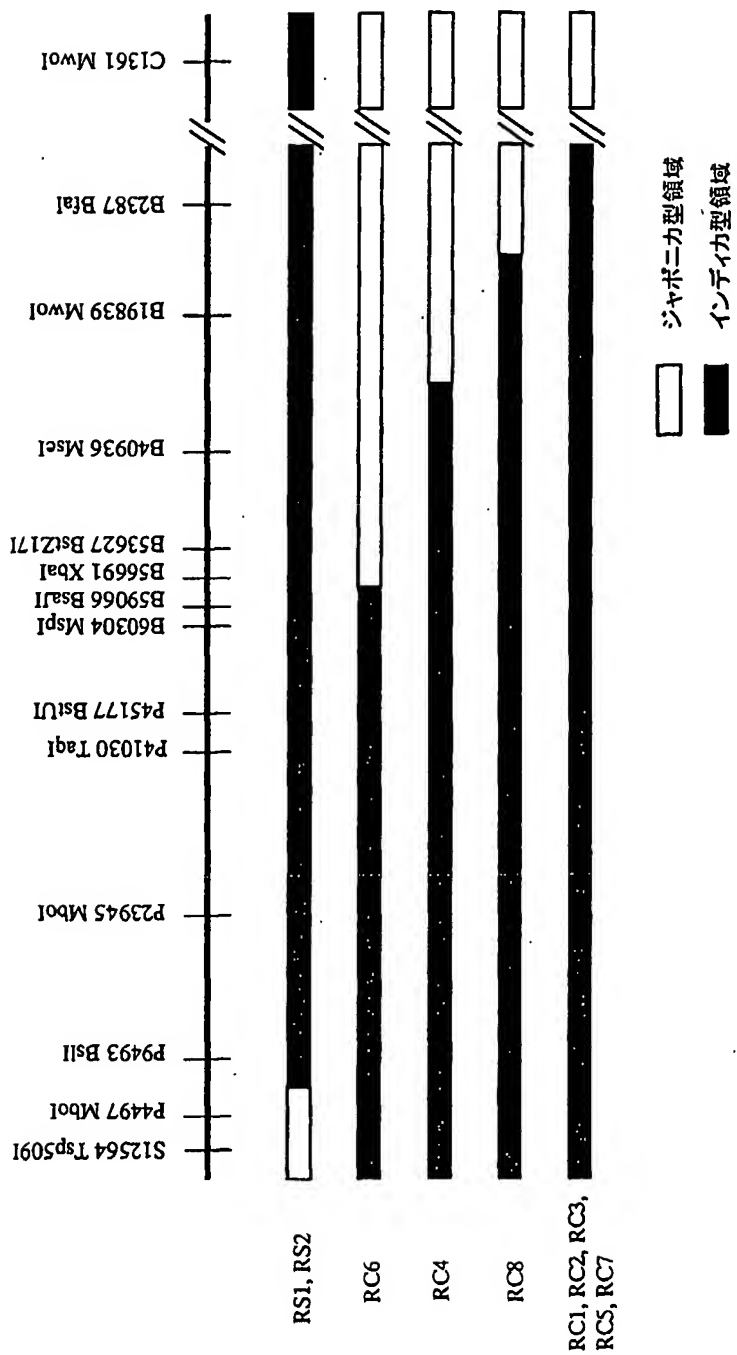
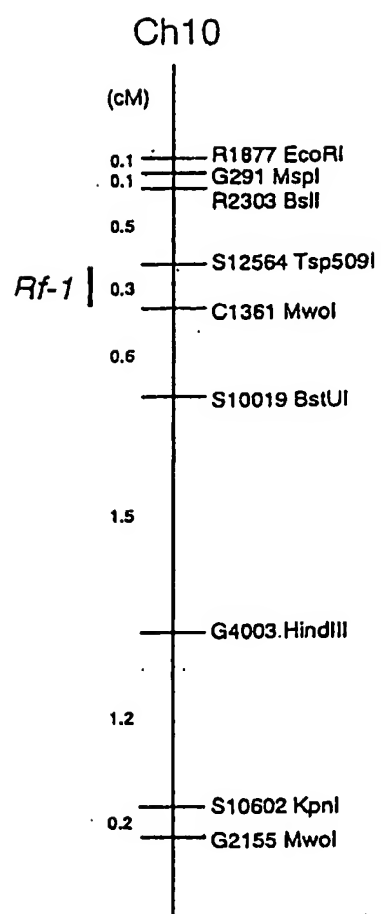


図4



5

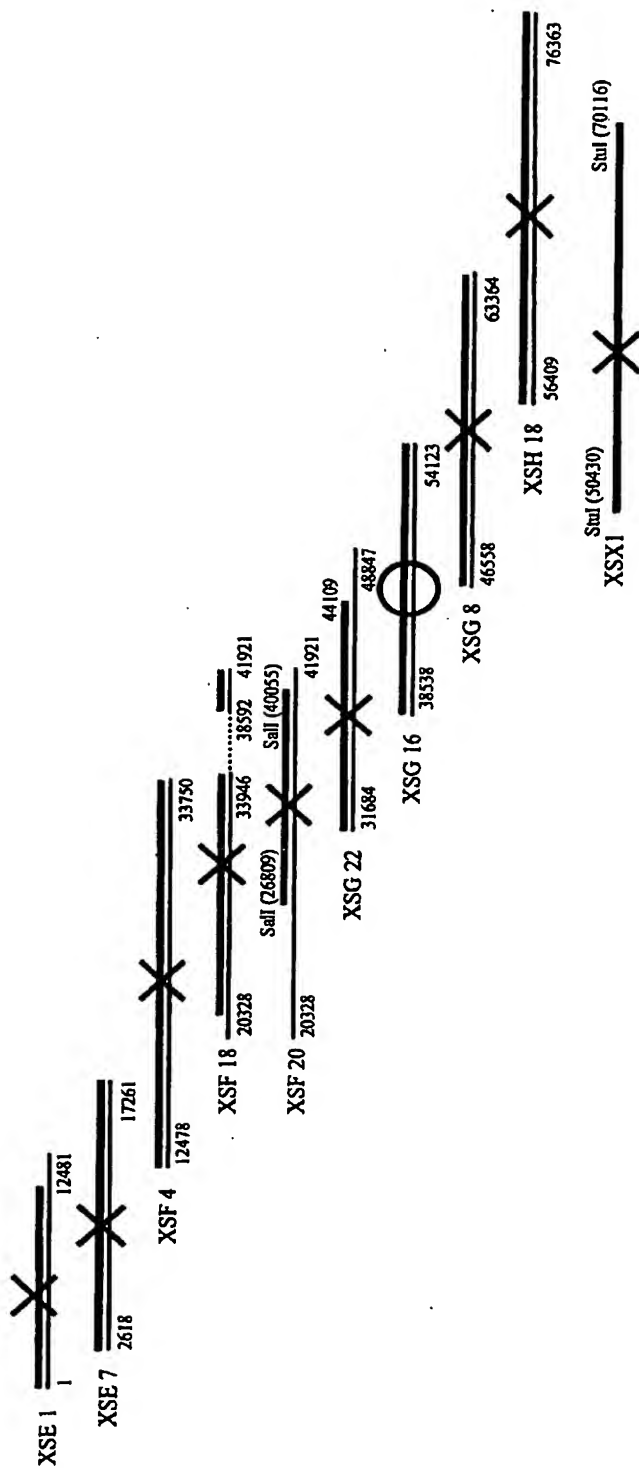


図 6



SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN TOBACCO INC.

Syngenta Limited

<120> A method for providing and controlling the rice fertility, and discerning the presence of the rice restorer gene by using the rice restorer gene to the rice BT type cytoplasmic male sterility.

<130> YCT739

<150> JP 2001-285247

<151> 2001-09-19

<150> JP 2001-309135

<151> 2001-10-04

<150> JP 2002-185709

<151> 2002-06-26

<160> 68

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of R1877 EcoRI marker sequence.

<400> 1

cattcctgct tccatggaaa cgtc 24

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of R1877 EcoRI marker sequence.

<400> 2

ctcttttctgt atacttgagc ttgacatct gac 33

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G4003 HindIII marker sequence.

<400> 3

gatcgacgag tacctgaacg 20

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G4003 HindIII marker sequence.

<400> 4

aatagttgga ttgtcctcaa aggg 24

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of C1361 MwoI marker sequence.

<400> 5

aaagcaaccg acttcagtgg catcacc 27

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of C1361 MwoI marker sequence.

<400> 6

ctggacttca tttccctgca gaggc 24

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G2155 MwoI marker sequence.

<400> 7

gaccaccaat taactgatta agctggc 27

<210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for amplification of G2155 MwoI marker
sequence.
<400> 8
tttctggctc caataatcag ctgtagc 27

<210> 9
<211> 27
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for amplification of G291 MspI marker
sequence.<400> 9
ctgctgcagc aagctgcacc gaaccgg 27

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for amplification of G291 MspI marker
sequence.<400> 10
acatTTTTTtC ttccgaaact tccg 24

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of R2303 BslI marker sequence.

<400> 11

atggaaagat acactagaat gagc 24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of R2303 BslI marker sequence.

<400> 12

atcttatata gtggcaggaa agcc 24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of S10019 BstUI marker sequence.

<400> 13

aacaatctta tcctgcacag actg 24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of S10019 BstUI marker sequence.

<400> 14

gtcacataga agcagatggg ttcc 24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of S10602 KpnI marker sequence.

<400> 15

agctgttgag agttctatgc cacc 24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of S10602 KpnI marker sequence.

<400> 16

tagccatgca acaagatgtc atac 24

<210> 17
<211> 26
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for amplification of S12564 Tsp509I marker
sequence.
<400> 17
ctagttagac cgaataactg aggttc 26

<210> 18
<211> 27
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for amplification of S12564 Tsp509I marker
sequence.
<400> 18
tttgtgggtt tgtggcattg agaaaat 27

<210> 19
<211> 2240
<212> DNA
<213> Oryza sativa L.
<223> PCR marker G4003 HindIII
<400> 19
gcggccgctc cgggaagtcg agcgagtaga cgcccctgac gccgtacgcg tcggcgagcc 60
gcagcggcgt ctctggcggt gtgaaggaca gcccgttcag cgtcgcgcgg cgccgcccgt 120

tgatcgtcac cggcgccgtg ctccgcagca ggtacgcctg cgtcacgttg atcgacgagt 180
 acctgaacga tccctgtggg ttccggcctcg ccgctccggc actcaggttc cacctgceca 240
 atgcaaaaaa ccaaaaccca aaagcttaat gcgaataata catcattcca cgtattttaa 300
 aaaataattt ataggtaaaa tttttataat gtatttttagc gacgtaaatg tcaatgctga 360
 gaaataaacg ataatacttt aaatgaagtt ctaaaattta aattttggca tcggttgatg 420
 ttggataaag aaaacgatgg aggctagtaa tttttcttct tttttaagta tctagattgt 480
 catatattga atttttcagt ttttcatccc tttagggaca atccaactat tattttcctt 540
 ttcttatgta aaaggttgaa caacatatcc aaacataaaa aaataaaaatt aaatgaaata 600
 aatttacaat tcataaaaatt tacagaatth atgttaagaa aatattcaaa cttagataat 660
 aataaagcaa caaaatcgta ctaaaaagaa gtataattgt acattgtata ctactactcc 720
 tacaatttta gacttagaat ttttaatttc ctgaaatcta gtaatgccat ttttttcttt 780
 ctagttgaac cagacagtaa gtttaactcg aaacttataa gctaattgagc gaagtcgggc 840
 aattcactcg tacctgacgg agcgagcttg gttcatggag aaggacttgt cgaactggtc 900
 ctggggaggg tcggggagcg ggccggaggc ccgcccccg gagttggagt agcggaggac 960
 ggcgacgccg gcgacgcggc gccacacggt gtcgttcacc atgcgcgcgc tggcgacgac 1020
 gtagtagtcg gagctcgcgt tctggtcggg ggtgacgagg aaggagtagg actggccgac 1080
 gtggacgtcc aggttgggtg agttctgctg cgtcgtgtag gagccctccg tctccaccag 1140
 caccatgttg tgccctgga tcctgaagtt gaggtcgtc gacgtccca cgttgtgcac 1200
 tcggatcctg tacgtcttgc ctgtgtcccc acaccgacgt cgccgacaca cgcgcaaaag 1260
 ataatagact cattgtaagt aggtagtaac cttctccgtt tcatattata aatcgtttga 1320
 ttatatTTTT gttagttaaa cttctttaag tttttttct ataaacttaa ttaaacttaa 1380
 agaattttta taaaaaaat caaacgactt ataataaaa atggatggag tagttgcac 1440
 aatttgtgga tgaagcaaac aagattatat cttttcatg aggtgaaag tattcagtga 1500
 acaattcgtc agtttcaagt ttcatgaaat cggacagggt ctctgaaagt ctgtattttt 1560
 ggtactgttg gattgactac tctggcttct gttgtcacat cttttgtatc ctagtttcgg 1620
 taaaaaaaat ttiggcattt ttactcctat cgttgatctg tttaactgaa accattgcat 1680
 gatatactac tagcagacaa aactgggtgaa aattcacgag aatgaacttt ttgtcagtta 1740
 agcattagcg gacagcttca gtaagcagag caggctgcct taaggcttaa agcactatct 1800
 tccacaacac ttgttcctac aatcaaattc caaatttact atcacaaaaa gcgaaggaa 1860

taactaaacc ttactcctac tagtactact gctatgacta tgaacaaga ttccaatcca 1920
aagaaaacac agtgctcgat cagcatgata aaagcaacga aacctgctca tccagctgcc 1980
aaaatgccac cccactgact ctacgtacgt actacgtatt gacgctgtaa aaaactagcc 2040
gtagtacaga gaagaggacc caaagtttcg tcaaaaattt tattttaccc ggatccacat 2100
tgatggctct gtactcgatg ccggccggga caaggctgtc gttgtacctg tacgggccct 2160
tgccgttaat cagcacgccg tccggcatcc cgaggctcct gccactgtcc agcatcttcc 2220
tcagatcctg caacgaattc 2240

<210> 20

<211> 2601

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.

<223> PCR marker C1361 MwoI

<400> 20

tcttgctgag atccaagttg cggtaacttt gcccttttct tttttcttc tcttctgaat 60
tttttcatgg tttttgggag agattttcgt aacttgatta cagttctagg aaaaggccac 120
cttgttcaaa cagggtcttc ttgaaaggga tcaatttgct aggagtacat gattctaaaa 180
gcgatttcga aataaaacac agttctcgat ctcatacctg aaaacaaaag gcccatactg 240
tgtaaaactgt gattatgctt ctgttaaagtg ggatatttgt acaaaattga cgccaaccac 300
ctataaacag attgtgagct tttatcttag taaaataaaa tgtgacattc tactcagtgt 360
tcagtgatcc gatgtcgtct ctctgcgta caacttctaa cagccgtttt cggtagtaca 420
aactagcgaa acaccaaaaa cgcagcattt gagttctgga atacgctgaa attgttagaa 480
tcaaccacga aaccaaatac attgttcaga aacgttgcaa cgagataaaa cacaagaact 540
tgttttaaca aagcatacgg acagtacata tacggttaca acaccagtc tttatacagt 600
tctgctggag ttccatctac tggctgtcat tgtatctcag gacagacagg ttaacatagg 660
tacaacacaa ttacaggcta aaccgaagcg aactacactg tcagcatctc taacagtatc 720
gtcaagcaag cttatttaca gctgctctag taaatttaca acgtccctgg cagaatccct 780
ctcgtttctg gcagcgacga ggcacgttc atggccttag caggacatct caccgctcag 840
ctgcatagaa agcaaccgac ttcagtggaa tcacctcctg ctctgcaaa aaagttgggt 900

cgatcaatca cgcgtttaat ccaaacaacaa atgggtatta attatgctag cctatgaagc 960
 tacctcagag ttctctatct gctctgcagg gaaatgaagt ccagtggaac agttctcaag 1020
 cacctcaggg ctcttcatcc atgctttgtg tgcttcaatg gctttcagct tatagcgaaa 1080
 catctgcgat acggatctaa aattaaggat gtcgacaatt acttaacaca acaataaatt 1140
 gaagcaggtc cagttaaaga aaagtagcag cgaagaatag cactctgaag tctgaacctc 1200
 agataaagaa atggttgggt tttccagttc atctccctca acatggattc cagtaccctg 1260
 gcattctggg caaaggatgg atgttatttt cttagggtgca tttttgcct ttcttccctg 1320
 attgcttttt cccttgcttg caattttgtc tgctagcatc tcatattggc ataaaatagt 1380
 ccagtgcaca aggcaagaag tgtgaaacaa atgaaatgcc tgcaaaatta gccgtacaaa 1440
 gtcattggag gttgcagcag aatactacaa atttttaag aagaaactat acactgtcta 1500
 tgttttgctt gaaatgaatt caaccacttt gcattatacg gtttggaatc cctggtttgt 1560
 gagaactgta attccattac aacagtgaag aagttaccat aactaatgaa tggaaattag 1620
 tcaaatgcct aatttttttag gtttgcttta atttatttat ctgtgagaaa tgctaagcat 1680
 gtcatgcgtt gctatcttca agaaatacta agaaactgca aaggcaaaga atgtttgaaa 1740
 taacttacct cgcttgagtt tctactgctg caggctagat ttctgtctt gcagttgagc 1800
 aaggtagcta catccttttc aagaagcatt ggtcgccac aaatatcaca agctttctca 1860
 gcagcaaggc gcttctgctt acgcaactcc ctctcatag atttgggtgga taagaggcca 1920
 actgaagat tgtgtgaagt acctgtcggg gaacctgtta tgatagcttg gctattgtca 1980
 tgggcggagc tgctttgctc attcgactcc tctgaagatg cttcttgatc tgaaaatgac 2040
 ttctttcttc tctttccacg gtgtccagca tcatcaatca cgaagaaaga tccagcagag 2100
 ataggaaggt cctgatcatc agaagaccac ttctgcca actcaattgt ataagagaag 2160
 ttgacaatgg caaagtcaga ttgtcatag gtgtcacact catccaagcc atgggagcca 2220
 tctgtccta cccaagcaca ccagatcttg ctaatctttt tacttcctt gctagcttcc 2280
 cataacctgt atgcaatatt tccatatccc aaaagatgca caggcaaact cgaaacaaca 2340
 tccttttagca atacactagg aataacgaga ggaccgtcag ttccacttg gtttgacagc 2400
 acatgatctt cagatacaga agcagttcta ccattaccat gcgcatttgc accacggcgt 2460
 gtgccttttg cgccattgcg agagctagaa tcatctctca acctcgaagt cacttcagtg 2520
 tcgttcgctg gaaccagagc cagctctctg gtgttctgcg agctcgagtc cagcaagagc 2580
 gggtccttct cgcgcgagtt g 2601

<210> 21

<211> 1333

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.

<223> PCR marker G2155 MwoI

<400> 21

```

ccctctgctt gatccagtgt acatccatgg gttaggacag attagttact cagttaatta 60
agtgtgagac tggaaaaaaaa tatctgacgg cagttttata agttgagtga ttgaactagt 120
gaaagttcag ttaactgtca acggctgtag atttgggatg gcagactgtt ctgagtcaaa 180
atgaagcttt tactgtgcgt ggttaccagg tgcagtaaaa taatttcaga tctaatacgca 240
gtaaaaaaat gtagtactat atgttaagac gagattggtc ggtcaaaatc tatctggccc 300
tttacatctc ccaaagtgtt cctcagttgc aggtggtaaa aaaaaatcac tcgtttcacg 360
tgatgtcggc agatcatgga ccatgtctca aatgctgaaa ctctgaacaa tcaacaaaaa 420
aatccaacca gatgagctgt gcaactgata attgatcatc acactatttg caactcatct 480
ttcatgtaga tggaacttca atcccgaaga aataatgaca gcaaaatgct gcgacacctga 540
agaaaggatg gcggcaaaat ggcagcgata aaaaaaaaaat ggttggttac tgaagaatta 600
tttgtgcagc agttgagaca gtagcaagat aagagctagc taagctagct aggtagagtt 660
ggatggaaga gtagtagtat gagatagagc atggagcgcg acaactcaag tggatgctaa 720
agtaaaaggc attctcttct cttgtttgga atcagaaaag aaaagaaaag acttgagctg 780
cttggctgga atgtttggtt ggatcatgcg cgctctcctt agcttagctc gccaaagaaat 840
cctcgcttca tctctctcaa taattcaaag ccacgagctc tctgctcata tccagtgcga 900
cgattcccgt taatgcaaat gcattatatc cagttcgaaa tgttacaatt cttgcgtttg 960
cagcaagcca gcaagtgggtg tgaattgttt aatccctcgt gcatttcaac gaaattctct 1020
caciaattcg cattgacttc tttcttagca caattagtaa gcagtgacaa ataaagaatt 1080
tttgaacagg atgtctttcc aaggaagggtg agatttttta tgtggatagc aaggatcgcc 1140
tttccttagc atgaagagaa tgtgatcaac ttacacctt gcttacgatt atggccttaa 1200
tttttgatac cctaaacagg agcacatcac atgcatgtcg acctgagacc accaattaac 1260
tgattaagtt ggcatttcag atgcatccgt cagttacatg atcaggtgat cgatggatca 1320

```

actgtaggtt tca

1333

<210> 22

<211> 863

<212> DNA

<213> Oryza sativa L.

<223> PCR marker G291 MspI

<400> 22

```

cgaacaggat caaaagtaga cgacgagggc atttagaagg agaggaattg tatttgttcc 60
cggtatttaa tttttaaatt tgttggtcgga agtttcggaa gaaaaaatgt gctcatgagt 120
gattattggc tctgaacacc aacctctctt ttcgttgatt ccttctgagg tggtgggtgt 180
tgggacacga tgctgccgcc gacacgacac cggttccac aatacactaa tctactcgcg 240
acaccttcat tgaactgcat ataattatth agaaagtcca ttaacacatc ttataaaacc 300
ttgttgaatc atataatcat tctataaagt ctatttgaac atcttatgaa aaaataagat 360
ctgacctagt cgttacactc tcttacatth tccattagcc taactaattc cgtgcaggaa 420
acgccccaaa ataatagtac caatagtcca ctaatcccgt gccagaggcc gccaatgatt 480
agtgattaac ccaaaaaaca taatcatcat cacacgccgc taatgaccag ctctcgctta 540
gctcatccca caggcgggcc ccacacgcca ctctgccat gtggggccac ctttcacacc 600
ccccaccaac cagaaaaaaaa actcccccaa aaaaaaaact tttaatgctt atctcgcggc 660
agtataaaag gcgacccacc caccacaca caatcacagt cagcgaccca acccaacccg 720
agccgaggag tcgagtcgtg tgaaaattac gaaattgcc ttcgactcca ccaccaccac 780
ccaccggcga ggcgaggaga ggagaaaaat tgggaggaaa aaaaaaggga aaaagaaaaa 840
gggtggagga gatthttgcg aag 863

```

<210> 23

<211> 1510

<212> DNA

<213> Oryza sativa L.

<223> PCR marker R2303 BslI

<400> 23

```

tgccatgaag acctatggaa agaatatctt cttctcactc tgtgaatggt gagtttactc 60
tctgtaacat ttagggctag gtcgaaggaa catgaagcat tgctgattca ctccactgtg 120
tttttttttt ctgtataggg ggaaagaaaa tcctgctaca tgggcaggcc gcatgggtaa 180
cagctggaga acaactggcg acatcgccga caactggggc aggttctact catcctctct 240
ttaaccctgt ttacatagtt cttgagtttt tcagtactga tcgtaattgc cctgttattt 300
cagtatgaca tctcgtgcag acgaaaatga ccaatgggct gcctatgctg gacctggtgg 360
atggaatggt aagaacttga gatgtatctg ttcctagggt gcttaacat ttgagagctt 420
caaaatgata aacatatgtt tctgctgtgc aatatcagat cctgacatgc ttgaagtggg 480
aaatgggtggg atgtctgaag ctgagtaccg gtcacacttc agtatctggg cactagcaaa 540
ggtaccatag catgttctat gtactaataa ttttgcgtga atgttgaact tctttgcatt 600
tcctcactgc aagttttgct tgaattgttc aggctcctct tttgatcgga tgcgatgtgc 660
gctcaatgag ccagcagacg aagaacatac tcagcaactc ggaggtgatc gctgtcaacc 720
aaggcaagcc ttctcagttt cacatgctta gatttagcca tacctcttgg atatttcacc 780
atactcataa tgtaactctc tgaacagata gtctagggtg ccaaggaaag aaagtacaat 840
ctgacaacgg attggaggta tcccttcaat ggcttccaaa tttgcagttt ctcatgtgcc 900
cataagcctt ggcatgatca tgactaactc tgaagctgac aatactttgt gtaaatttgt 960
cggtagggtt gggccggggc actcagcaac aacaggaagg ctgtggtgct ctggaacagg 1020
cagtcatacc aggcaaccat cactgcacat tggcgaaca tcgggctcgc tggatcggtc 1080
gcggtcactg ctcgtgatct atgggcggta aagcctttgc tttcttcaga gctcaaagta 1140
gaacatcttc tcttcagaat tcagagttca taacaaattt ctgtcaattg tgcagcactc 1200
ttcgttcgcg gctcagggac agatatcagc atcggtggcg cctcatgact gcaagatgta 1260
tgtcttgaca ccaaactagt cagcaaagaa aagcagcaca ggtagtacg tgtccggcga 1320
atacagctaa attgatcagg attcaggaag aaggtttgca atttgcaagg attggtagag 1380
ctggaaatgg gatgccattt ggttatgtat gtagaaataa gctgtaagcc tgtaagcgta 1440
tatgtaatca gccgtcaaat gctggcgagt gtatttctga agtttgcaac gaaagttgca 1500
gcaataaaaa

```

1510

<210> 24

<211> 1016

<212> DNA

<213> Oryza sativa L.

<223> PCR marker BstUI

<400> 24

```

tggggattct tttctttaag caatttaaca ttattgtcct aacaatatac acaatattgg 60
tttttctttc agtatcaa atttctttta cttttgaaaa cacatttgca atgtgttgga 120
aacacaatta tatcttgcaac ttccttttgg aaatttaatc atttgaaaac tgattcgcgt 180
ttcatggctg taatcttctc ttgcgaacat cgctctttct ttgatggttc tctgttgaga 240
agaagagcaa ccaagtaa at ttcgaaatg tttttttgtt ctttctattc accattgcag 300
gttgtcaaag ccacgagaa ggccataccg attccgagag cgcaacccat tgccttgat 360
ggcccagcaa gggaagagct gaaggccatg gaggcgcaga aggtcgagat cgaccgcacc 420
gcggcgctcc aggtgcgcgg tgagctttgg ctggggctgg catacctcgt cgtccagact 480
gccggcttca tgaggctcac attctgggag ctctcatggg atgtcatgga acccatctgc 540
ttctatgtga cctccatgta cttcatggcc ggctacacct tcttcctccg gaccaagaag 600
gagccctcct tcgagggtt cttcgagagc cggttcgcgg cgaagcagaa gcggttgatg 660
cacgcccggg atttcgatct ccgccggtat gacgagctcc ggcgagcctg tggcctgccg 720
gtggttcgga ctccgacgag cccctgcaga ccgtcgtcgt cgtcgtcgtc gtcttcgacg 780
caggagagcc attgccattc ttactgccat tgccaatgat ctttgtgtg ttctgttctg 840
ttgtcagaat tttttcatgc ccagtttatg ggggttaagc tagcttctcc attgtaccgt 900
tctgatgtgc ggatgatgcg atgcaaagca tagtttgttg aagagatgac aaggcagatt 960
ttagcttgaa aacctggagg tgagaaaaaa aaatcctgat gtgtttgtgt gtgtga 1016

```

<210> 25

<211> 676

<212> DNA

<213> Oryza sativa L.

<223> PCR marker S10602 KpnI

<400> 25

accaccttca tatgaagaaa ttaacggtgt tttcatgagg aatccaacag tcgctgaatt 60
 ggtggaaact gtggaattct tcttggtga ggtaaccaat catcacttca ccacaatgca 120
 caagtttgta gcttactact acagtacttc taataagttt tgtctgttga gattttattg 180
 ctgattttcta tgcattggtca tctttttgac aggccatcca gtcttatcgt gctgagagtg 240
 aaactgagct caacctggca gctggtgact atatagttgt ccggaaggta cggccctatc 300
 ttcccatggg acatgtttct aaccataaac atatctttgc tggacttttg tgggcaaagt 360
 tggctacact aaacttgtgt tcattaacct gctcaatcag gtgtcaaaca atggatgggc 420
 agaagggtgaa tgcagaggga aagctggctg gttcccttac gactacatcg agaaaaggga 480
 ccgtgtgctt gcaagtaaag tcgcccaggt cttctaggcg ttcaatgagc catacataca 540
 taaccctggg gttgtacact gtattatgat cgttcgtgat cttcaaagac cctctgatca 600
 gagaaatcac aaatattctt ttgttctatt attgtcatta tcaactacccc ttttgtcaaa 660
 accagtgcag cctttt 676

<210> 26

<211> 1059

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.

<223> PCR marker Tsp509I

<400> 26

gcgagatcat gaacttgatt ttctggttgc catattgggc ttgcttgta accttgtaga 60
 gaaggatagc cttaataggt aagtcctca catgttcct tccatttgct caattcatat 120
 cagtgttact gtcttggtcag ttccttgggg tcaggactca gaaacatcca attaattgttc 180
 atgttctctt aacgactcag aaatacttta taacctctcc acagggtacg gctttcatct 240
 gcccggtgtc ctgttgatct atctcagaat ccacagagtg aagagacaca gagagatgtc 300
 atagcactcc tctgttctgt attcttagca agtcaagggt ctagtgaagc ttctggaact 360
 atatcacggg taattcaaaa ttcttcaagt tccttttgta ttagattat atctttgtaa 420
 aactcggeat ttattacctg ctctttgttt caaaaagcag tattttattt tgctccttag 480
 cataggtcag cagaacagtt gatcttattc agaaaacaat attttgcag taacatactg 540
 ttatctatga gatgaaaatt aatgcatgtg taataatgtc aatgataaat atttgctatc 600

tgaatccagt ctaccaactc tagttagacc gaattactga ggttctatTTT caaagaataa 660
 tttagtgcac catttgttca actactatga agtaaaatgg tattcccttc tattgacatc 720
 gggttagaag tgaaaggcca tcttaatgCG atgttctcaa tgccacaaac ccacaaatTTT 780
 cattaacaca tacagattat tattaacata gctataaatt ggatttccag aagcttgagt 840
 tgaatttatt ttgttacaat tgaaagcact gggaacatta gcattttttt ttagttcttg 900
 gttattgcaa ttataatgt tatacagaac tgtgtacctc acaatgcatt cattatgaca 960
 ttctatgaac catttgattg actgttgctt gtaaacaaca ggatgatgag gagtctttga 1020
 tgcaaggagc acgggaagct gaaatgatga tcgtagagg 1059

<210> 27

<211> 76363

<212> DNA

<213> Orza sativa IR24

<400> 27

gatcaactaa caacctcttt gcagcaaaaa agcatacaca caagtgtttg tcttggcctg 60
 gggctctgca gatggactga tactctgacc tgcagtgggc ttgggagcta acaatggttt 120
 cattctttttt ttttttatgt tttccctgt tgtttttgct catgttttgt gtaatttttt 180
 cttctcatct agcgatgtta ttttcttag catgatggga gtagccctcc ttttttttc 240
 tctaattaag tgtaaagtag caacagcata gggatgaatg ttcagtgtag tgtgtggtgt 300
 ttcagttatt cagagacgtc catacagttt gtaccttggtg accacacgtc ttaatctgat 360
 gaagcttaga ataaatcaca tgttagcaat gcaatatcat ctgcgtcttc tctcactttg 420
 gtggccatca aattctgtgt agaagtgtat ggttggtgtg ctgttgcaaa tgccgtattc 480
 cgctctgttt tgtggaagtt aagaagtccc tagttgaaat accgattttt catgatctcg 540
 gagattgatg caactctgat tgcagcattt ctttttatta gaatgtacac tccatgctat 600
 catgatgttt attgtttagt actacaagat ttgggtaacc attattttta tatcataata 660
 attttataaa atcttgaggt aacaagttca taatacatga tagcataact ttttgaggct 720
 agtctatgta tattgtctcc tttgttttta aactaagcac tcaataaatt attgatggct 780
 gtaattttct gaaggtttca ccggtttcgg cccgtgcttt ataaatagct tcggcacaaa 840
 agacaaaacg gtccttccaa cacataaatg gttgagtta cgttttcatt atcttttgta 900

aaatcaagtc caccacgtag acactcataa caaaagtgtg aatatacctca gaaattttga 960
cttgagtcta tcttaccttt gatateggac atccaaccct ccctccctcc ctgaacttta 1020
tattattcat attacacctg aactttatat tattcatatt acaccctgaa gtggttttca 1080
tttaattgca tacatgctga aatagtttga caacgtgaga tgcactaaaa atctacacgt 1140
tcgtcttaag ttgcaattca ttttatccct tttctttttc tctcttacat aggaatatca 1200
atagtactaa ttcacattac aatatagtat aaattggtaa tcgattattg gcaatatact 1260
atattaaata ttcaaaacta gtcatttaag ctgccaaata agtaaaccac tatcgaaaac 1320
cacaatataa atggcattac aaaacttagg gggttgaata tccaatttta aagttcatga 1380
tgctagagga atttctatca aaagtttatg ggtacatatg gactttttcc tttttaaaag 1440
aagctatttct tgtcgtaaac gttaaattat tttgtactt tattttttat gattgaaaaa 1500
aaaacttagt tttcaaatg attggtctgt atacaagcat caattagact taataaatc 1560
atctaacagt ttctggcag aaactgtaat ttgttttgt tattagacta cgtttattat 1620
ttcaaatatg tgtacgtata tctgatgtga caaccaaacc caaaaatttt ccctaactcc 1680
atgaggcctt acagatatat ttgatgggtg taaagttttt taagttcttt gggtgcaaag 1740
tttttaaagt atacggacac acatttgaag tattaaatat agacaaataa caaacatat 1800
tacatattct gcctgtaaac aacgagacaa atttattaag cctaattaat ctgtcattag 1860
caaacgttta ctgcagcatc acattgtcaa atcatagcgt aattaggctc aaaaatatc 1920
gtctcgtaat ttacatgcaa actgtgtaat tggttttttt ttcgtcaaca tttaatactc 1980
catgcatgtc caaatatttg atgcgatctt tttggccaaa tttgttgga atctaaacaa 2040
ggatcaaatt tgctgaattt ttccagacgt cacggcttgt tcatccatcg ttgcacgc 2100
gattcgccac cgacgccttg gtttccaacg aattttatca tccgcttaaa tacatccaaa 2160
gctctccatc gccatcggcg gccaacggcg accgctccgc tctaccaat ccacccatcc 2220
actcgccgcc gccccctgat ccaaagcctc cgccgcgccg ccgtcgagag gaggaggagg 2280
aggaggagga ggaggcgtga gcccttatgg ggaccctcct ccggccgcgt ccgcttgccc 2340
acgccgccgg cgccggcgac gccacgccgt cgaccgcgca cggtagccac gcgcctctcg 2400
agaggcccc ccccccgcc gctcgtgat ctctctctc atcctgtttg ggtttgggtt 2460
tgtgatttgg gtgttttttt tttttccgca gcggtggtgg tgagcggtgg ccgcggccgt 2520
ggcgtggagt gccagccgca tcgggtgcgc cgccgccgg gtccgcaggt tgcggtggcg 2580
acggcgagct ggaggaggcg gagggagacc gtggtgagat cggatttcgc cgctggtggt 2640

gccgctacca tgggggattc gccgcaggcg ctctcagggt tgcagcctcc tccactctct 2700
tctcgcaaaa tgtgttgcta tgttcctctc gctgggctgg cctcatagcc attaatgtag 2760
tttgctggaa cattacattc ggaacgttgt tggcaattgc ttgacaaaat gtggaattgt 2820
ggaggggaga aaaatcgttt gaacctgcag tgacaaaatt gccatctata attttaaaac 2880
tgaagggtgtg gaaatcaaac ataatcattg ccagcacatc attcttgta accaccttga 2940
catattgttg gcttataaca gttagctcca caccaacttg gaagggtgtca atggaatgta 3000
agtataaatt gaggataact ggcagttgtt aagactttct acagaacttg tagcagctaa 3060
aactagctat tgtgcattta tgtttcatgg aatttgagcg gcaatggata tttcttacta 3120
agacgtataa tgcaaaaaaa aaaaaaaac tatgtctatg cagtttacat gtaatgtgcg 3180
gatgcaaata aaatcatgtt catggacaaa ctaatgggat tcataccaaa ttccagaatt 3240
gcatttctta tgtggttact tttgtttgtt gatttggtta ccagacatcg atgtggtttc 3300
aagggtcaga ggggtttgct tctacgcggt gactgcagtt gcagcaatct ttttgtttgt 3360
cgccatgggt gtggttcac cacttggtgt cctatttgac cgataccgga ggagagctca 3420
gcactacatt gcaaagattt gggcaactct gacaatttcc atgttctaca agcttgacgt 3480
cgagggaatg gagaacctgc caccgaatag tagccctgct gtctatgttg cgaacatca 3540
gagtttcttg gatattctata cccttctaac tctaggaagg tgtttcaagt ttataagcaa 3600
gacaagtata tttatgttcc caattattgg atgggcaatg tatctcttag gagtaattcc 3660
tttgcgcggt atggacagca ggagccagct ggtatggctg tagtctcatc cctgctttct 3720
taagtagaca tatatacatt tacagtattt ggtaaataaa caagatttta tgaatcatat 3780
atgattttgg ggaaaacaca aaactctctt tgttggtgc cttgaacata gttctgttca 3840
cacagttata gcaccttctt taaaatgaag aactttgttg catacacata aggccaaacc 3900
acataatgaa ttttgtttat ttctatcttt gaatgttagc atcgtttttg tttaatgcat 3960
gatgccttc ctatatattt gtagtatgtc aacattgtat tccatgctga gcataacaaa 4020
tggtttgtta aaattcagga ctgtcttaaa cgggtgtgtg atttggtgaa aaaaggagca 4080
tctgtatttt tctttccaga ggggactaga agcaaagatg gaaagctagg tgcatttaag 4140
gttcagtaac caaacttagg ttacattaca tctaagaga tttttatatt cagtatataa 4200
tggttaacct ctcatggtgt actgacgtgg ttataaatgt cccagagag gtgcattcag 4260
tgtggctaca aagaccggtg ctctgtgat acctattact cttctcggga cagggaact 4320
gatgccttct ggaatggaag gcaccttaa ttcaggttca gtaaagctca ttattacca 4380

tccaattgaa gggaatgatg ctgagaaatt atgttctgaa gcaaggaagg tgatagctga 4440
cactcttatt ctaaacgggt atggagtgc ctaaagaaag atgggtgttt tttttattat 4500
atggaacctt ttcaaaggca cagacaggct ttcaaggcta agcttggttac aggtactgat 4560
actagttact aattactttc gtaatcagta taaataagct tgtgtagtgt aatggcattg 4620
tacatttctg cacttggtta atttacagaa gaggcaagta atattttaga ggattgagtt 4680
tattcaccca gtcatatagt tgaagaggca agtaacctgt aagagaggac tgaacattaa 4740
cacctcttgt tcgattaaaa atgaccaaag agcatcaaac atgtattcga ggctgttact 4800
ttagatatgg cccattaatt tgttttagtg tctatgtaca tcctagttgg tgtaaagtc 4860
agttaccatt tctatgatct aaaacaatca actcttttag tatattttca aaaacgaaat 4920
tcagtacaca tgtatgaatc ttaatatctt tctctagctc gttacaaaag caacaaaggc 4980
accgtgtcag ctgggttcaca ttagctagtt tgtacttagc attatccact agcaccttat 5040
tttcatgcat atcatgctaa tttgcttgcc cacgttgagt gggaattttt ttcattgttt 5100
ataatttata tatgttttag acttctagtc cacaatttat gtacttcatg ttcttgagcc 5160
tctagtatgg ctgatagcag actaggtgct gagtgtgtc cttttttgca gactgaagag 5220
agaagaaata caagactgtc cattgttagt cagatttgta aaaatagact ctgatgtagt 5280
ttacttttgc ccctatttta tttttaacaa tacaaatata taacagatcc taagaactta 5340
tcttaattta ggagaagttg ctggtttcat taaattaaat tgtgaagtaa aaatgtgtgc 5400
tcgagtctgt caatgcaatc ctgtgttctt gtttgaagat atgggtgtagg gcaggccagg 5460
attgaacact gaatggtaag actgcttctg ccttcagacg ttattgctaa attttttagct 5520
acttgcagtt agtgctgcca cgccgattaa gcagtagaac aaagtagttt tgctgtgcac 5580
aaatgagtta tatttcattg gaaatcgaag cgaaaacgaa tcaaaagtta gaagaaaagg 5640
ggaaacttgg taattactcc ataaagagag tgcattttat tggtaagatg gtatccggaa 5700
gctgtgagct cggggctgta tgtattctgg caaatttgat atgagatgct cgattattgg 5760
cttaagttag cgatatcaaa tttggggaag caccaaagga attattgtga aggagttatg 5820
gggtgcgtgac gttatctgct aggttcaaat ccttgtggct atgaatattt atctgctagg 5880
ttcaaactct agtgactatg aatattaatg ggtaaggtaa gggatttatt gttaatttta 5940
gtttctttta gattgtgcca tcggacgcca ttcggtaact gtaataatgc tttgtattgg 6000
attcacttgt gttacatgca cgactaaac atgtgcttta ccttttcacg tgtttttgcg 6060
ttctgggcta gaaactcaaa cgttgaattt tccatggtct gctcaacttg acaattactg 6120

cgtgtcaagc gatcttatac gcatactatg cgcacaagtg attgtatacg gatatgatga 6180
cagtataacg tgtgatattg atttttttaa taaaaaatg atgttcattt ccttgatgaa 6240
ggaacaaaga ctttttttaa aagaagggtg ttactaaaaa caaaaatgac aaaaacaaaa 6300
tatcagtga catggcaagt gtgctcggca attttttctc tgtactttaa acaaaaatac 6360
ttctatatgt tcttttttat aagggtggca caaatctttt aaatgagcca aatatctaca 6420
ttggatttat taaaaactgt ataaattata atttatactc tgaaagggtg tgtgcatctc 6480
tcttgagaaa aatgtataag ttgcaaaca acattaatcc acgttatgta acttttttctc 6540
gccggaaagg ccgaaggagg cctgacggag cgtggggctc ctcaccggga gaccgcgag 6600
gcccccttt gccggttcgg ccggggactc agggtgaaat tctaagctct ctgtatgtgg 6660
aagggttcgag accgtcgaaa gagcataaga cacgggcgat gtatacaggt tcgggcccgt 6720
gagaagcgta ataccctact cctgtgtttt gggggatctg tgtatgaagg agctacaaag 6780
tatgagccag cctctccctt gttctgggtt ccgaatctgg aaaagtcag tccagtcctc 6840
ccctctaagt gggcaaggtc ctccttttat atcttaaggg gataccacat gcaccatctc 6900
cctcctttct gtggagactt accctacctt ttcataaatg gacggagatt tgtatagttg 6960
ccgtccgaat gaccttctga taggacggcc catacctacc tccacttccg ccgaaagcag 7020
gtgcgacgtg ggattatggc tgtctgctga cgacatgacc agtgtcagac tggtcacaaa 7080
ttgctcattc ctgtccacca cgcgtcagtt tagcaatcta catgttggcc cttcttcaca 7140
caacatcttg cctgtaatgg ttaggatgaa gcctggcata tatctaacca ggactaacgt 7200
gccatctcta ggaggttaaca cgctagctcc agctggggac gagcgccctag aagccctcgt 7260
cctgacggga tggggcgagg cgtgcgtcag atgcctgtc gccacctaac ctgcgatctg 7320
accggtctgt gactgggtcac agaccgata aacgagtga ctgcacttcg ttacatgcag 7380
cgtgacacgc tcagccaaac cgcaataaat gtggttaggt gagccccgt gtgctcacct 7440
aaccataca cgcggagcaa aaaccacga ggggtcgggg cgctcggcc ctcggggccg 7500
aggcgggtgc ggtccgaccc cctcgggggg actaagagga gggcgaacac atcacctcg 7560
ggcccgcgt ccccgaggg tgccaggcca cgtgggcgat tgtgtctgcc tcaaacctct 7620
agtcgatgata ctctgatcc catgtcaccg acagtagccc ccggcgttat gccagggcga 7680
tcgcccctct taagggaagc ggtcgggcgt gacgccactc ctaaggcctg gtgacaggtg 7740
ggaccggtct ccacaattgg gcagaaaccc aacggtcaca aatcacgcac atcggaatg 7800
gtaactctac tatcaataat gagcgtctc ttcaagactg ccacattact cgagtagcac 7860

acgaatctgg acatggcgat tcgtttcgtc tggagatatg gtaacgtcgc tttggtcggc 7920
gagcgtaatt aacgcgcgca cgatatgacg tatctcgact gccacaaccg catatccacc 7980
tcatgcgccg caagcgggcg aatgggatta gtggaagcgt gggcgcgaga aacgaggggg 8040
cgaaatagtg ggcgcgagaa gcgaggagcc gggcacagcg ttggcaagag tataaaggca 8100
ctgaggaaag gatctgtttc cttcctttcg ccatcatttc ccttgtcttc gccgcttgcg 8160
ccctaactcc ttctttctcg tgctctactt tcgccacacg cgctcgctct caatcttctc 8220
ttcctccggc gccatggcac ggggtccgc tctgctcgat ggtagcgtgc tgccgccttc 8280
ccgcatcgat agcgagaggc aggtctgggt gccgcgccg ttcatgccg aatctgccac 8340
cggccgggag atagtcacgc tgggcgaggg acgcccggcg ccagactacc cggggcggtc 8400
cgtcttcttt ctcctctttg caatggcagg gctggttccg ccattttctt ctttcttcat 8460
ggatgttctg aagttctacg atctccagat ggcgcacctc accccaacg cggtgatgac 8520
attggccatc ttgcgcacg tgtgcgagat gttcattggg gtgcgccat ctcttcggct 8580
gttccggtgg ttcttcaccg tgcagtcggt gtcgcccca tcggtagttg gtggctgcta 8640
cttcagcca cgggggcccg tgctgaatcg ctacatcccc tgcgccctcc gcaagaagtg 8700
ggacgactgg aagagcgact gggtctacac cccctcgcc gacgaagcgc gcctccgact 8760
tccgagccag ccccgggcg aggcctccag ctggcggcg ccggtagatc tgggggatgg 8820
ctatgacgcc gtcctcgacc gcctggcggg cctacgatcc caggggctca cagggaccat 8880
gggtgacggc gactacctc gtcgtcgat tgccgcgtc cagcggcgcg ctcgggcgcg 8940
ctgggagtac accgggtccg aagactacat gaggaccac cagggagtca gatgggactg 9000
ggctcctgag gatttcaaga tagtgggtcca acgggtgctg aatctcaact ccatggaggc 9060
gtccctcatt cccaaggaa tctcctct ctgcagcgat ccagaccg cctccatct 9120
gaccattatg acggcggctg gggcctcaga ggagttagct ccaaagggcc acgacggcg 9180
aggcgggagc cgtagggggg atcaatctac ccggggaggg ggtcgtgctt ctgggtctcg 9240
cgacggaggc ccgaggagca gccgccctgc cgacgcccg gggaagagga agcagggagg 9300
aacacctccc ccatctctc cccgaggggg cggggcggtg cgtgccagca gcaggcgccc 9360
ggagggggcc gcgccgacat cgcagcccga gggggagcgc aagaagaagc ggctccgcaa 9420
gatgggggag acagaaccat ctgaggaaa ccttatttcc cctctaaagt ggtcgtttta 9480
ccgacccct cgcaggttcg tctctaccc atcgtggctg tattcattct ctcaacgcga 9540
gttttcactc acccatcttg ttctcttct ggtcttttct tctgtttcag cgagatcccg 9600

tcgcgtccct cccgccattc caagtccggc cagtctgagg ccgaggatcc ggcggccgca 9660
gaggcccggga ggcgggaatc tgaccggcga gaggccgcgg atcgccctacg ggaagccgag 9720
gaggccgccc aggaggccgc ccgggctcgc caggctcagg aaaccgctcg ggaggaggcc 9780
gcccggggccc gccaggccga ggaagccgct cgggaggagg ccgcccgagc ccaccaggcc 9840
gaggaagccg ctccggagaa agccggattt cgccaggacg aggcaatggc gacttccgag 9900
gcagctcgcg atgaggtcgc gggcgcgtcg cttgagccca cttcctcggg cgacgctcag 9960
gcgacaactt ccggggcagc tggcgacgag gctgcgggcg cgtcgcttgg gccactccc 10020
tcaggcgacg cccaggacca accaggtccg agggacatcc ctgagtcgg cacttccatc 10080
ggcggccccga gccgcgtggc atcctctcca aggcggctct tccccacgcc ttctatcgcc 10140
ccactgagcg cagagcccct tctgcaggcc ttggccgccg caaacaccgc ggtgttggac 10200
gggcttagtg cccaggtgga ggccctgcaa gcagagtggg cggagctcga cgccgcgtgg 10260
gcgcatgtcg aggaggggcg gcgctcagtg gaggccatgg tggaggtggg ccgcaaggca 10320
caccgccggc atgtctcgga gcttgaagcc cgtaagaagg tgttggcgga aatcgccaag 10380
gaagtggagg aggagcgggg ggctgccctc attgccacca gcgtgatgaa cgaggcgcag 10440
gacaccctcc gccttcaata cgggagctgg gaggcggagc tagggaaaaa gctcgacacc 10500
gcccaggggg tgcttgacgc tgccgctgcc cgagaacagc gggcggggga gaccgaagcg 10560
gcgtcccgac ggcgcgaaga gacccttgag gcgcgcgcca tggcgctgga agagcgcgcc 10620
tgcgctcgtg agagggatct ggcggaaccg gaggccgccg tcactatccg ggaggcaaca 10680
ctggcggcgc acgagtcgcg ctgtgccgaa gaggagtccg cactccgcct ccacgaggac 10740
gcgctcaccg agcgggagcg agctctcgag gaggccgagg ccgcggcgca acggctggcg 10800
gacagcctgt ccctccgca ggcagcgag gaggagcagg cgcccgccac tctggaatgt 10860
gtccgcgccg agaggaccgc actgaaccag caggccgctg acctcgaggc gcgggagaag 10920
gagctggacg cgagggcgcg cagcgacggg gcggctgcgg gcgaaaacga cttagccgcc 10980
cgccctcgctg ctgccgaaca taccatcgcc gatctgcagg gcgcgctaaa ctcgctccgc 11040
ggggagggtcg aggccctccg cttggcaggc gaggtagggc ccggcatgct ttgggacgcc 11100
gtctcccgcc tagatcgcg cggtcggcag gtgggcctct ggagagggcg gaccgtaaag 11160
tacgccgcca accatggagg cctcgcccag cgcctctcga agatggccag ggctctccaa 11220
cggctccccg aggagctcga gaagacaatt aagtcacct cgagggacct cgcccaagga 11280
gcgggtggagc tcgtactggc gagttaccag gccagggacc ccaatttctc tccatggatg 11340

gcgctggatg agttccctcc tgggaccgag gacagcgcg cgcaggtcc gggatgccgc 11400
cgaccatata gtccacagct tcgagggctc agcccctcgg ctgcggttcg cccccaactc 11460
cgacgaggag gacaatgccg gtggtgcaga cgacagtac gatgaggccg gcgacccggg 11520
cgtatcggat tgatcccca agccccgcc attcttagt tttttcttct tttccttctt 11580
ctaaggcctt cgggcctctt ttttgtatag atcaacttaa tctgtaatca aaaatgaaga 11640
aatttttgtg tcaatttcat cttgctgtgt gtatgagatg aggatgatct gtgacgtggt 11700
ccttttgcgt cttagcttga ttaagggctc gtgcccagggt ccagtcctc aaaaggcgtg 11760
ggtcggggct agtgcctggg gagatccaca tgtcgagact ggccaggccg ggaacgtggt 11820
gaccgagggt tatgggtgac ccgattgtgg gttttgccg attccccccc ggagttcacc 11880
acgccccggg gcacggctcg gttctgggcc ccgtttggcg attttagccg acccgagccc 11940
ccgagggcag gattgagcac gattgaccta tttcaagtca agattcttca aaaggaaaaa 12000
aaaacacaga tacagccttt aggaaattga aactgctttt attgaaatac tgaaataaga 12060
gaaataagaa tgtgcatgtg tggcagcccc cggccaacgc tgcacgcccg aggggggtgcg 12120
gggttgggcc gagcccgaaa cctgacaccc gacccccccc tcaggggtag aagcgacgaa 12180
gggtgttcgat gttccacggg ttaggcagct caatgccgtc gcccgtggcc agccgtatgg 12240
agccccggcc ggggacgccg accactcgat acggaccctc ccacattggt gagagcttgc 12300
tcaatccagc acgcgttttg acgcggcgta ggacgaggtc gtcgacgcag agtgatcggg 12360
cccgacgtg acgctgatgg tagcgccgca ggctctgctg gtagcgcgcg gctctgaggg 12420
ccgcgcgccg ccttcgctct tccaagtagt cgaggctatc tctgcgaagt tgatcttgat 12480
cagcctcgca gtacatggtg gcccgaggag acctcagggt gagctcggat gggagaaccg 12540
cttcgcgcc gtagacgagg aagaaaggcg tttccccggt tgctcggctt ggtgtagttc 12600
ggtttgccca gagcacgcgt agcaactcct cgatccatga atcgctgtgc ttcttgagta 12660
tgttgaagggt cttggtttta aggcctttga ggatttctga attggcgcg tccacttggc 12720
cattgcttct ggggtgggca ggtgaggcga agcagagctt gatgcccag tcttcgcagt 12780
agtcgccgaa gagttcacta gtgaattggg tgccattatc cgtaataata cggtaggca 12840
ctccaaaccg ggccgtgatg cccttaatga atttaagtgc ggagtgtta tcgatcttga 12900
cgaccgata agcctcgggc cacttagtga acttgtcgat cgcgacatac agatactcaa 12960
acccgcccgg ggccgccta aacgggccca ggatatcgag cccctagaca gcaaatggcc 13020
acgaaagtgg tatggtctgc agggcctggg ccggctgatg gatttgcttg gcgtggaatt 13080

gacacgctct acatcgccgg accaggtcga ccgcatcatt gagagctgtc ggccaataga 13140
aaccctggcg aaaagcttta ccaaccaagg tgcgcgaggc ggagtgggct ccgcattcgc 13200
cttcatggat atcggcaaga agcacaacgc cttgttcccg aggaatgcac ttcaggagga 13260
ttccattagc cgcgcgccga tagagggtcc cttctaccag cacgtagcgt ttggagatgc 13320
gatggacgcg ttcactccct tcgcggctct cgggtaaagt cttatctgtg aggtatgctt 13380
ggatctcggc aatccaagca atcaatctaa gggagctggg agcgcctccc tcgggtcccg 13440
aggcctggac ttcgacgggc ctcgggggcc ggtcaggcgc gtccgtctcc cctaaggggt 13500
cgggtcgcgc cgacggctgg gcaagccttt cttcaaaggc gcccgggtgg gtctgggctc 13560
gcgtggacgc gagccgtgag agttcgtcgg caatcatgtt atcccgtctg ggcacatgcc 13620
gaagctcaat cccgtcaaaa tggcgctcca tacgccgtac ttggcgacg taggcgtcca 13680
tctgcggtc agagcaccgg tactccttac agacttgggt aacgaccagc tgggagtcgc 13740
ctaaccaccag gaggcggcgg atccccagtc cagctgccac tctgagtcg gcaaggagtc 13800
cctcgtactc tgccatattg ttagtcgctc gaaagtcgag gcggaccaag tatctgagga 13860
cgtctccgt cggagaggtc aacgtgacce ccgcaccggc gccctgaaga gacagggagc 13920
cgtcgaactg cattaccag tgggcgggtg gaggcagctg cgaggggtcc gtgctggcct 13980
cggggattga gacgggctcg ggagccgggg tccactctgc cacaaaatcg gcgagagcct 14040
ggctcttgat agcgtgacgt gggtcaaagt gcaaatcgaa ctcagaaagt tcgattgcc 14100
atttcaccac ccgtcctgta ccctctcgat tatgcaagat ttgaccgagg gggtaagacg 14160
taaccacagt gaccgatgc gcctggaaat aatggcgagc tttcctcgag gccatcagaa 14220
tagcgtaaag catcttctgg gcctgagggt atcgggtttt ggcgccccg agggcctcac 14280
taacaaagta gacgggccgc tgcaccttc ggtggggccg atcctcttcg ctaggggccg 14340
catccctggg gcactcttcg tccaagcagc ctgcggggc gcacttgtct tctgtgctga 14400
tgacctcggg gtcggaggat aacaggggcg gcctccac agtggctttg gggccgtcct 14460
gggggtcagg ggctcctggc gtcgtcggac aagcgggcaa agggccaact ccggtcgtca 14520
ggggccttag gcctccgttc ggctcggggg cctcttctcc ctgctcttc ccgggtcgag 14580
tcagcacagg gttagcctcg gggtaaagg gcgatagggt cggccttccc acagtggcct 14640
cagggccttc ctgggggtcg ggggtccta gcaccgtctg acaagcgggc agagggccaa 14700
ctccggtcgt cgggggcctc aggccaccgt tcggctcggg ggccctcct ccctgctctc 14760
tcccgggcca agtcggcaca ggggtggggaa gcgcgaaatg agaattatcc tcatcgcgt 14820

ccacaaccaa tgccgcacta actacttgcg gggtcgccgc taagtagagt agcaagggt 14880
cgtctggctc cggggcgacc ataactgggg gagagcttag atacgccttc aactgggtga 14940
gggcattttc agcttccttc gtccaggtaa acggtccgga gcgtttgaga agcttaaata 15000
agggtaacgc cttctctccc agcctcgata tgaaccgact tagggcggcc atgcaaccgg 15060
tgacgtattg cacatcccta agtttgctgg ggggcgcac cgtctatag cccgtatctt 15120
ctcggggttg gcctcaatgc cccgggcaga gaccaagaac ccgagaagct tgcccgcagg 15180
tacaccgaac acacacttat cggggtttaa ttttatgcgg gcggagcgga gactctcaaa 15240
agtttccgct agatctatga gtaacgtttc ctggttgccg gtctttacaa ccaagtcac 15300
gacataagcc tcaatattac gtcctaattg gctaccgaaa gaaattcgag tagtacgttg 15360
aaaagtagga cctgcattct ttaaccgaa gggcattgtc gtataacaat aggttcctat 15420
gggggtaatg aacgcagttt tttctcacc ctcctagcc atgcgaatct gatggtaacc 15480
agagtatgca tctagaaaac acaaaaggtc gcaccccgca gtggagtcga caatctgac 15540
tatgcgaggc agggggtaag gatccttagg acatgccttg ttaaggtcgg ttagtcgat 15600
gcacatccga agcttgccgt tcgccttggg aacgaccacc gggttcgcca gccactcggc 15660
ggggttgacg ctgccatcat atttttcggc gatggtgggc cggaaccttg gggccaacg 15720
gacattccga agactcgcca caaaggctct acagccgaca ccaccaaccg ggggcacgga 15780
gggctgattc ccgcgtccgt gttgaggtga cactctggac gaggaagcgc cctccgttg 15840
gtgggcagca cttcggtcac tacgccggcg ctcgatgctg gtgcggcggt ccggcccccc 15900
acgcagatct ttctgggtcg aaggagtcga cgaaggagt gcggccgaat ggccaacagc 15960
ggctgccgct cgtcgtgccc tccgtcttga cgacgcggag ccggtggtag cagcaccaga 16020
ggccttggtg gggaggacc gccaccagc atctaggcgc tgccgtgccg tcatgactaa 16080
tttgccacg tcgtccagcc atcgttgggc tggagactcc gggtcaggga cgacaggcgg 16140
gtgacgtaag agcgcgccc cagcttgag cgcccttg ggctgctgc cgtcgccgta 16200
gacgaggagg cgacgtccc catctcgcc ttcttctcca tcgccgga tcggtgaagt 16260
cgcgatctt tcgacctct cgagcgctc ccccgctta ggactttggc atggaggag 16320
cggtgagta cgagctcgac ggcgtgggtt cggtcccg tcgtgccac tcacactcg 16380
agagaggtcg tgccctttg cttgctcggc catcaggctg aacaggaaaa gcttgcgca 16440
cacggaagag tacgagagct cagaaaaaca cactagat cccctacctg gcgcgccaga 16500
tgacggagcg tggggctcct caccgggaga ccgcgcaggc cccctttgc cggttcggcc 16560

ggggactcaa ggtgaaattc taagctctct gtatgtggaa ggtttgcgac cgtcgaaaga 16620
gcataagaca cgggcgatgt atacaggttc gggccgctga gaagcgtaat accctactcc 16680
tgtgttttgg gggatctgtg tatgaaggag ctacaaagta tgagccagcc tctcccttgt 16740
tctgggttcc gaatctggaa aagtccagtc cagtccagtc cccccctcta agtgggcaag 16800
gtcctccttt tatatcttaa ggggatacca catgcaccat ctccctcctt tctgtggaga 16860
cttaccctat cttttcataa atggacggag atttgtatag ttgccgtccg aatgaccttc 16920
tgataggacg gccatacct acctccactt ccgccgaaag caggtgcgac gtgggattat 16980
ggctgtctgc tgacgacatg accagtgtca gactggtcac aaattgctca ttcctgtcca 17040
ccacgcgtca gtttagcaat ctacatgttg gcccttcttc acacaacatc ttgcctgtaa 17100
tggttaggat gaagcctggc atatatctaa ccaggactaa cgtgccatct ctaggaggta 17160
acacgctagc tccagctggg gacgagcgcc tagaaacct cgtcctgacg ggatggggcg 17220
aggcgtgcgt cagatcgctt gtcgccacct aaccgcgat ctgaccggtc tgtgactggt 17280
cacagaccgg ataaacgagt gcaactgact tcgttacatg cggcgtgaca cgctcagcca 17340
aaccacaata aatgtggtta ggtgagcccc gctgtgtca cctaacctat acacgcggag 17400
caaaaaccca cgaggggtcg gggcgctcg gccctcgggg ccgaggcggg tgcggtccga 17460
ccccctcggg gggactaaga ggaggcgaa cacatcacc ctcgggccga cgtccccga 17520
gggtgccagg ccacgtgggc gatttgtgtt gcctcaaacc tctagtcatg atactcctga 17580
tcccatgtca ccgacaaggc catccgaatg tattaaggag taaaagtac aagaaaaaac 17640
accataatgc accaatgtgc atgaccacac accatacact accccaagc acaaaccact 17700
gagggtgaag cctagcacca aacgaccgc actaagtgtg accaaacgcc gctaggccta 17760
cggcagcaac acatagatga gacttcgaaa acgatgccac caaggtggtc acgacatcta 17820
ggatgctgcc atcgtccatc taaaaagatg tggttttcac ccagagaaac tcatcaagaa 17880
ggggagaggg taacccttga cagcgcccca aggaggttac gacgcccga ggcgtagccg 17940
ctgccggtcc ggtgaaccac cggactaggc ttccgcctag gacctatag cttgatcgc 18000
agatcacctg ccaccactca gaaccaccac acagacaaaa ggtagcacgt agcttcacc 18060
acaccgcacc gacgccccct cgtcggccga ctccatcgaa ccaccatccc tgagagctgg 18120
cccaggaccc ctccgttcca ccaccgccg gccgccttgc cagttttggc caaaggagaa 18180
cccgggactg ggtgacattg ctteggcagc ctgagcttcc cccgctggcg agctgctgtc 18240
tcaatccaac ctagaaactc cccgcaaaag aaggggatga gctctaggaa gggcgagggt 18300

gccgaccggc aacgaggaag acaaccatc gactccagct ccctttgcac taccatctgg 18360
ccctgcgcca atgccggata cgctgtcgtt ccggctccgg cgccaccac ctgcaccccc 18420
tttgcttggc ctccgcgccc ctcttggttg cgtcgcgccc ccagctggc cgctaagggc 18480
accgcgacgg ccgcccggct accgaggcct ggccgcgcca tgggacagct cgcgttgga 18540
ccagcgagcc acggccgtcg cgctgttgcc ggccgagcg agcacaaccg ccagctccaa 18600
gggcccagca tgccactgag ccgcccgcg tgccgcccgg gccggctgca cgtcaccggc 18660
gcacacgacc gcacgcccgc acgtccgccc tccgcgcccg aggcagcccc atgccattgc 18720
cgcgcacctc gcccgcccgc tgccgagcgg ccaccgcgca ccttgctgag ccgccaccgc 18780
cgtccctagc cgctcgtgc cgccgccacg ccagatccag gcgcgggatg gccggatccg 18840
gccttggggg cgccggatcc accgcctccc cacaccgcca cggcgtcacc acctccgacc 18900
gcagttaggg cttcgtcgtt tgccccatcc tcctcgcgtc gaggaggaag acgccaagaa 18960
aaaagggcct cgccgctgccc ttcttgctc gctgccggct tcgcccggc cgagctccgg 19020
cgccggcgag gtgggggaga agaagtgggg agtgggcagc tagggttttt tcgccccca 19080
agccgcccgt gcgagagcga cgggtggggg gggggggact ttccaacctc ttccagtgtt 19140
ctagttctcc acgttatgta actcaatttg ttaaccata gaaagtaaga aacctaccag 19200
cgtgttaagc tctctttcat tccctttctt ctctctggtt ttgcttccat cacatgtcaa 19260
gtgaagggtt cttaactacc attactcta cacatcta ttttttctca gatctttcgc 19320
aggtatatat tgatgtaca ttttatgat ttaagataat ctcttcaca ttaccctctg 19380
ctgaaacttt agcttgaacc gtcatttca ccacaatttg agcccaattt gcacagagca 19440
caacgagcaa tagcttgccc ttacgttcat tatttagcat gaactactac taactacca 19500
agaatcaata caccggttta ataacgcat tttatcacgt taatatatgt ttcatccaac 19560
acaccggttt tggcacagtt gcaaacttgc aataaattct ttctacttc tccatcccat 19620
aatataacaa attggtatgt ctgctctggt actaagttac tatattatga gatggaggga 19680
gcatttcttt tcttccaaaa tataagaata tagtattgga ttagatatta tctagattca 19740
cgaattcgat taggttgtct agatttatag ttgtatgtaa tgtataattc ggtaataggt 19800
tattacctct caggatggag ggagtagttt tgactttttt tttcttataa atcgctttga 19860
tttttatatt agtcaaattt tatcgagttt aactaagttt atagaaaaaa attagcaaca 19920
tttaagcacc aactagttt cattaaattt agcatggaat atattttgat aatatatttg 19980
ttctgtgtta aaaatgctgc tatatttttc tataaacgta gtcaaattta aataagttag 20040

actaaaaaaaa atcaaaacga cttataatat gaaatggagg aagtagtaga ctataacaaa 20100
tttaaaccgt gctttgattt tagagcatca ctaatatgtt agcaataatc tatccctaaa 20160
atttattttt tttcctaaac tgaaaatagg aagtggaaat actcctccat ctaagagaga 20220
gcctaaattc aataaaaaac taaaaaacta aaggtggatc cctctattaa actaccgcaa 20280
aaaatttatg ttttttttct cttccacgcg cgcagaacag atatctcgat caagttagca 20340
tgtaaaattt ttaaagagat accttatacg actccttcg tatttccaaa agcaaacgga 20400
tttaaaatct gactcaaata aagatctata tatccaattt acatgacaca tgtttcgccg 20460
aatttttata ttaataataa ttaatatttt taaaattaaa ttattagcaa tttgtttgga 20520
ggatttatca aaacaggatg gacgttggtt ataacagcgt ctagacctag acgcgcttgc 20580
aaactgcggc caccctttta tcacacaaat ttttgacaat ttgacacttt ccaaaaatta 20640
attttataaa ttaaccgtga ccaaaactta tttaaaaatg atctttttgt tgagcgcaaa 20700
atcgtatact tcagcgccaa atagcacggc gccgacctcc cccttcccct cccctctatc 20760
ctccactgct gccgcccacc tctccgtatc agctgcgtcg cgttggtttc cgccggcgct 20820
gctgctgctg caccagtccg ctagggcggg cgggcatggc gcgccgcgcc gcttcccgcg 20880
tccgcgccgg cgctgttggc gcccttcgct cggaggggctc gacccaaggg cgagggggcc 20940
gcacgggggg cagtggcgcc gaggacgcac gccacgtgtt cgacgaattg ctccggcgtg 21000
gcagggggcg ctcgatctac ggcttgaact gcgccctcgc cgacgtcgcg cgtcacagcc 21060
ccgcggccgc cgtgtcccgc tacaaccgca tggcccagac cggcgccgac gaggttaactc 21120
ccaacttgct cacctacggc attctcatcg gttctgctg ctgcgcgggc cgcttggacc 21180
tcggtttcgc ggcttgggc aatgtcatta agaagggatt tagagtggat gccatgcct 21240
tcaactctct gctcaagggc ctctgtgctg acaagaggac gagcgacgca atggacatag 21300
tgctccgcag aatgaccag cttggctgca taccaaatgt cttctcctac aatattcttc 21360
tcaaggggct gtgtgatgag aacagaagcc aagaagctct cgagctgctc caaatgatgc 21420
ctgatgatgg aggtgactgc ccacctgatg tgggtgcgta taccactgtc atcaatggct 21480
tcttcaagga gggggatctg gacaaagctt acggtacata ccatgaaatg ctggaccggg 21540
ggattttacc aaatgttggt acctacaact ctattattgc tgcgttatgc aaggctcaag 21600
ctatggacaa agccatggag gtacttacca gcatggttaa gaatggtgtc atgcctaatt 21660
gcaggacgta taatagtatc gtgcatgggt attgtcttcc agggcagccg aaagaggcta 21720
ttggatttct caaaaagatg cacagtgatg gtgtcgaacc agatgttggt acttataact 21780

cgctcatgga ttatctttgc aagaacggaa gatgcacgga agctagaaag atgttcgatt 21840
ctatgaccaa gaggggccta aagcctgaaa ttactaccta tggtaacctg cttcaggggt 21900
atgctaccaa aggagccctt gttgagatgc atggctctctt ggatttgatg gtacgaaacg 21960
gtatccaccc taatcattat gttttcagca ttctaatatg tgcatacgct aaacaaggga 22020
aagtagatca ggcaatgctt gtgttcagca aatgaggca gcaaggattg aatccggata 22080
cagtgcacta tggaacagtt ataggcatac tttgcaagtc aggcagagta gaagatgcta 22140
tgcgttattt tgagcagatg atcgatgaaa gactaagccc tggcaacatt gtttataact 22200
ccctaattca tagtctctgt atctttgaca aatgggacaa ggctaaagag ttaattcttg 22260
aaatgttgga tcgaggcatc tgtctggaca ctattttctt taattcaata attgacagtc 22320
attgcaaaga agggagggtt atagaatctg aaaaactctt tgacctgatg gtacgtattg 22380
gtgtgaagcc caatatcatt acgtacagta ctctcatcga tggatattgc ttggcaggta 22440
agatggatga agcaacgaag ttacttgcca gcatggcttc agttggaatg aaacctgatt 22500
gtgttacata taatactttg attaatggct actgtaaaat tagcaggatg gaagatgcgt 22560
tagttctttt tagggagatg gagagcagtg gtgttagtcc tgatattatt acgtataata 22620
taattctgca aggtttattt caaaccagaa gaactgctgc tgcaaaagaa ctctatgtcg 22680
ggattaccga aagtggaacg cagcttgaac ttagcacata caacataatc cttcatgggc 22740
tttgcaaaaa caatctcact gacgaggcac ttcgaatgtt tcagaaccta tgtttgacgg 22800
atttacagct ggagactagg acttttaaca ttatgattgg tgcattgctt aaagttggca 22860
gaaatgatga agccaaggat ttgtttgcag ctctctcggc taacggttta gtgccagatg 22920
ttaggacctc cagtttaatg gcagaaaatc ttatagagca ggggttgcta gaagaattgg 22980
atgatctatt tctttcaatg gaggagaatg gctgtactgc caactcccgc atgctaaatt 23040
ccattgttag gaaactgtta cagaggggtg atataaccag ggctggcact tacctgttca 23100
tgattgatga gaagcacttc tccctcgaag catccactgc ttccttgttt ttagatcttt 23160
tgtctggggg aaaatatcaa gaatatcata ggtttctccc tgaaaaatat aagtccttta 23220
tagaatcttt gagctgctga agccttttgc agctttgaaa ttctgtgttg gagttctttt 23280
ctcctacagt cgtattagag gagggatctt ctctttatgt gtaaatacg aggtatgtat 23340
gtcacctctc cgaattattt ttactctggt tcctagacgg taaacaagca attatgttct 23400
gcctttgatg ccagaaaaaa cacaaaagtt tgtcgttatc tctactaacg gatcataaag 23460
gaatttgtaa ctggagtttc aaacttaatt tgtctaggca gtagttttgg cattagatcc 23520

aacattgtgt aggattcatt tgttgtatc aatctatagg gtttcattaa atttcgttta 23580
tgtgtactgt ttaggtgttg aatagtttg cttgtttttt aactgaacaa aagatactga 23640
aatcggtcca ttcaacaaac acatgttccg ttaatgaaat tattgtacgt taccttttgt 23700
tttcttactc acaagtgtcc tcttttctta taccctatag attggtacaa caaattattg 23760
attcaatttt ggttttgaac attgatgatc ctcctgcac tattggtgca gctgctcttc 23820
tattcatttt gtgaagtgat gtgagtacct ctcaatccca tccttatgct tctgtgcatg 23880
cttcattcca attttttacg catatcgatt gttttctttt atataacagt ccataaagat 23940
aatcacatca tgacaaagtt atttatttct acagtatagt tatataagta ttcaccagtt 24000
ttccatgaat attttggcat gtgattacaa agaagattat ttgagaaaat ccatgctttt 24060
atttcatcat ttgtttgaa gttgaacttt aatttatggt gtaaatttca gttattattg 24120
ctagcagctc gtactcttta atggtataac ttcacttggt ctattctcc aatatctccc 24180
ttcttgttgt tcaggtcaa gaaaatcatt tgttggttc agaacttggt gtccattttc 24240
ttcttaaatt attaaatcct ccagtgaatc ttgttgatc caaagcacca tcgataggtt 24300
ccaaacttct tggaatcagt aaagttcaaa tgcttaatgg atcaaataag gattctgact 24360
gcatttcaga ggaaatcctt tcaaaagttg aagagattct cttagctgt caagtgatca 24420
agtcgctcga caaagatgac aagaaaacaa caaggccaga actgtgtcca aagtggcttg 24480
ctttgttgac aatggaaaat gcatgcttgt ctgctgtttc agtagagggt aagttttaat 24540
caaatttctt ggtcatgatt tccctttatg accattatat ttatttatat gagccaaata 24600
agcagttgtc aacttgcatt aagttacata gcacctattt gcaatattca tgggtggttt 24660
gcttagccct tttcttcacc tgcttttgat tgatgacttc catctgtgtt gcagaattga 24720
attggagtag tggactgcac tagaagcacc tatggccatt gtcatactag gaaggttttc 24780
ccttatcaaa tatttgattg ttacagagac ttctgacaca gtgtccagag ttggaggaaa 24840
ttttaaagag acattaaggg agatgggagg tcttgatagt atttttgacg ttatggtgga 24900
ttttcattca acattggaga tgagatctcg ctaacatcgc atattttaca tttcctttgt 24960
tcaactctaa tagattgtgc aggttgttc cttttcgcca ttttagcttt aatgcgcttg 25020
aagccacatg aaagtaatgc ttgtccagat acatagccaa aggttggtat attttggggc 25080
atggaaaatg cttgaggtag taactatttt catcaggaca tggaaaattg gctgcaacac 25140
aaattatgtt gttttatgtt gcaaaaatag ttttttaata cttttttatt ctgcatgtgg 25200
tgttagtatc ttacagttcc tctgatgatt atatcccca cgataataac acttgaaacg 25260

ataataacac ttgacatatac tacaccaagt gaacattatt catttgatg ttacttttcc 25320
agctatactt gctgttcttg catgtgtaag caagtttgga gtaaattgag cattaattta 25380
aatgcttggt gttcctatct gtgtactttt tattcccaa ctaataatgc aatcatatta 25440
cgctgataaa ctgaataaat aaattaacaa tatacttctg gtggcaaacc ttgtgtatca 25500
gaatctcata aaggatacat ccacttcagc tttggaccga aatgaaggaa catctttgca 25560
aagtgtgct ctcctcttga aatgtttgaa aatattggaa aatgccatat ttctaagcga 25620
tgataacaag gtaatgctcc ttatatgttc tgtttcagtt tagtaccat ttccttcttc 25680
tgtactatct tctctcctga tttgttctgt gcaaaatgtg caaacagtgc gactttgtat 25740
gtctgtctaa caattttctt ttcttctga aaaagcaata tgaactctta cattcatttt 25800
gcttcttgca gaccatttg cttaatatga gtagaaaatt gaaccgaaa cgctccttgc 25860
tttcttttgt tgggtgtcatt atcaacta ttgagttatt atcaggtatt tttcttaata 25920
atacaatgtg ttcgctaaca caataaaatg ttttaacat ccagtatgtt aaagttgcag 25980
tctgacgcct attttgtttt gctgcagctc tttcaatact tcagaattct tctgttgttt 26040
ccagctctac atatccgaaa tcgtctaaag tctctcaaca gagttactct ggtaataaca 26100
aacaccaatt ttgtttgatc agttgatctc gttggctttt ctatgcactg tctcaatata 26160
gtttggtcgc cattcaagtc tctactacaga tgttgaactt ggcttgacac caaatattta 26220
taaaatgcta cctgatattt ttaatatttc atgtttcctg acccagatta tctgttggt 26280
tcctcgata agtttaatta gtgacattct tgaagctttg ttatgcagca gatgtcatgg 26340
ggggaacttc atttaatgat ggaaagagca agaactcgaa aaaaaaaac tttgtcgaa 26400
ccagacacgt cattgttgc tctcttcaa atcagaagtt tctcatatta ctatatcttc 26460
tggtagtgt gctggtctgt cacagaaggc attcaattgt tctccattta tatcaagcaa 26520
tggggcatca agtggttcat taggcgagag gcacagcaat ggtagtggt tgaagttgaa 26580
tataaaaaag gatcgtggca atgcaaacc aattagaggc tcaactggat ggatttcaat 26640
aagagcgac agttctgat ggaactccag agaaatggca aaaagactcc gtctatctta 26700
aaatgtaatc accgacagt gtggttggtga tgacctttt gcatttgacc gccgcgtcg 26760
cgtcgccacc acgtaatgc ccacgtcgt gccccgctg ccacgtcgtc gaccgcgcac 26820
ggtaatcaca cgcactctga ggccgccgt agctgatata ttctcatccg gttgatttgt 26880
gattttggcg tttttgcagt ggtgatggcg gggggcgacc gtggccgagg cgtggagtgc 26940
catccgcatac aggggtgtatc ggccgcgtc ctccgccctg gtccgcaggc tttggcgcg 27000

agctggcggc ggagggagac tgtggtgaga tcggatttcg ccgctggtgg tgtcgctacc 27060
atgggggatt cgccgcaggc gctctcaggt ttgcagcctc ctccactctc ttcctttttt 27120
tatttttttt tctcgcaaaa tgtgttgtga tgttcgtctc gctgggctgg cctcatagcc 27180
attaatgtag tttgctggaa catttacatt tggaacgttg ttggcaattg ctttacaaaa 27240
tgtggaattg tggaggggag aaaaatcatt tgaacctgca gtgacaaaat tgccatctct 27300
aattttaaaa ctgaaggtgt ggaaatcaaa cataatcatt gccagcgcat cattcttggt 27360
aaccaccatg atatatgtgt ggttataaca gttagctcca caccaacctt gaagggtgtca 27420
atagaatgtt tagtataaat tgaggagaac aggcagttgt taagactttc taaagaactt 27480
gtagcagcta atactagcta ttgtgcattt gtgtttcatg gaatttgagc agcaatggat 27540
atttcttact aagatgtatg atgcaaaaca aaaaactatg tctatacagt ttacatgtaa 27600
tgtgcggatg caaataaaat catgtacatg gacaaactca tgggattcat accgaattcc 27660
agaattgcat ttcttatgtg gttacttttg ttgttgattt ggttaccaga catcgatgtg 27720
atttcaaggg tcagaggggt ttgcttctac gcggtggctg cagttgcagc aatctttttg 27780
tttgtcgcca tggttgtggt tcatccactt gtgctcctat ttgaccgata ccggaggaga 27840
gttcaggaaa aaaatttgaa aatacccatt tttgaaaaa gatttacgtt tatatacact 27900
agtatgaaga atttgcgaaa atataactaa tccgcagatc ggttatgcgg gagcgcaaca 27960
aaagtatggc gtggcggcgc ggagtggacg gccgaggcgt tcgcgcggaa tggggctgcg 28020
ggaccgagcc agtctcgctt gccggtaacg cggaaccggt acgctcccgc agcgccagtg 28080
tgcggaaccg cggcgccaac atttttttac tgcattggcac tgtgtttaat actgtttgac 28140
actgtttctg gtactgtttt acacagttcc egggtcagtt ccgcacaatg gagcgcgggc 28200
accgaccatg aacaatgtgt gaacagtgtc gcacagggtt aaaacagtgt ataaactgcg 28260
ctgcacagtg ctggagtcgc tggccactgc ggttccgcgt tttggaaccg cgggaccgtc 28320
gcgattccgc gttttggagc tgccggacca tgacggttcc gcgcaggatc gtcggtcccg 28380
tattttgaat ctgcggaacc gtcgctgtcc cgcgtttcca tttcgcggga tgcgtatatt 28440
tttataaaac ctctccatgc atgtatataa acataaatta ttgaaaaaat aagtatatatt 28500
gcaaattttt ttcgagagct cagcactaca ttgcaaagat ttgggcaact ctgacaattt 28560
ccatgttcta caagcttgac gtcgagggaa tggagaacct gccaccgaat agtagccctg 28620
ctatctatgt tgcgaacat cagagttttt tggatatcta tacccttcta actctaggaa 28680
ggtgtttcaa gtttataagc aagacaagta tatttatgtt ccgaattatt tgatgggcaa 28740

tgtatctctt aggagtaatt cctttgcggc gtatggacag caggagccag ctggtatggc 28800
tgtagtctca tccctgcttt cttaagtaga catatatgca attacagaat ttggtaaaca 28860
aacaagattt tatgaatcat atatgatttt ggggaaaaca ccaaactctc tttggtggct 28920
gccttgaaca tagttctatt cacacagtta tagcaccttc tttaaaatga agaactttgt 28980
tgcatacaca tatggccaaa ccacataatg aattttgttt atttctatct ttgaatgtta 29040
gcaccttatt ttcattgcata tcatgctaatt ttgcttgccc acgttgagtg ggaatttttt 29100
tccatgtttt ataatttata tatgttctag acttctagtc cacaatttat ctacttcatg 29160
ttcctgagcc tctagtatgg ctggtagcag actaggtgct gagtgcgtgc catttttgca 29220
gactgaagag aggagaaata caggactgtc cgttgtagt cagatttgta aaaatagact 29280
ctgatgtagt ttatttttagc ccctatttta tatttaacaa tacaatatata taacgtatcc 29340
taagaactta tcgtaattta ggagaagttg ctcgtttcat taaattaaac tgtgaagtaa 29400
aaatgtgtgc tcgagtctgt caatgcaatc ctgtgttctt gtttgaagat atgggtgtagg 29460
gcaggctagg atcgaacact gaatggtaag actgcttctg ccttcatttg tgcacttggg 29520
gctgccacgc cgattaagca gtagaacaaa gtaattttgt cgtgcacaaa tgagttatat 29580
ttcattgaaa atcgaagtga aaatgaacca aaagatagaa gaaaagggga aacttggtta 29640
ttatatactc cacaaattta ttggtaagat ttgatattag acgctcgatt acttggtta 29700
agttaaggat atcaaatttg gggaagcacc aaaggaatta ttgtgaagga gttgtgggtg 29760
cataacgtta tctactagtt caaatcctag tgactatgaa tattaatgag taaggtaagg 29820
gatttattgt taatttttagt ttctttaaga ttgtgtccga gtacaccatt cggtaagtgt 29880
aataatgttt tgtattggat tcacttgtgt tacgtgcatg tgcttttacc ttttcatttg 29940
tttctgcgtt ctgggtatga atttgacgag attccatggt cagctcaaca tatcagttac 30000
tgcgtgtcaa gcgatcttat atgggtatgcg cacaagcgat tgtatacgga tatgacagta 30060
taatgtgtga tattgatacg atgttccttt cctttataaaa ggaacaaaga ctttttttaa 30120
aaaaagaagg ggtattacta aaaacaaaaa tgtcaaaaac aaaatatcag tgcacatggc 30180
aagtgtgcac gagcaatagc ttgcccttac gttcattatt tagcatgtac tactactaac 30240
tacgcaaaaa tcaattcacc gattattaaa ctgttaacat cattttagca cgttaacata 30300
tgtttcattc aacacaccgg ttttggcaca ttacaaaact tgcaaagttg caatactccc 30360
ttcgttacat agcataagag atttttaggtg aatgtgacac atctatccaa attcattata 30420
ctagaatgta tcaccgcctc cacgccggga gggagagcgc cgccggtgga gaaaggggga 30480

gggagtggtc gaggggaacc agtagggtgc cctccccgtc gccgcctccc cgtggccgcg 30540
ccggcgagac aggaggaaga gggggagatg gagcggcgcc gccggtgagg gcgcgcgtgc 30600
gcgggggggg ggggggggga gcggcgacgc cggtgaggaa gggaagggga gtggtggctt 30660
tgagagagat aggggagagg gaaaatgatt ttagagttag ggtttgggct gctgagtttt 30720
tatatagatc gggatcaatc aggaccgtcc atcagatcgg acaactacgg tttctccgcg 30780
gttgggccgg gtgccactcc taggttgccc acactattgg gccacatgta cgctccgcgt 30840
gaaataagtt cacttttagt cttttaagtt gcctctgaat tgttcccagg ccggccgcac 30900
tattgggcca ccccataggc catgtgtacg ctccgcacag aataatttcg ctttagctcc 30960
cttaatttgt cccctcaaac ttctaaaacc agtgcaaacc ttttaatttt agttcaccca 31020
ttgcaactca cgggcatatt tgctagtac atataatatg aaacgaagga ttagcagac 31080
tatagaattt aaactgtgct ttcattttag agcatcacta actgttattt agatttttat 31140
ttaaataaat gcagaaatga tgtttttatt atgaaaatta gcaataaagc tcccaaaatt 31200
tcaaaaaaaaa attaaaagag atttattaat catggttaat ttaattaaaa attaaatcta 31260
accatatcat attatttcac ggtccgtgat gaggaaatgg cagctgctat cacttatggt 31320
gggagagaag gggcattgtt tatttttata actatctctt ataactcca tgaactata 31380
aaataaatat aatcattatc ataacattag tttttttcca ttgcaacgca agggtaat 31440
ttcagtacaa taaaaaata aaagtgggcc attctgaacg gaaatttctg gtttttttc 31500
ccaagagcgc cgcacacaac tgcgaagag atcgatcgcg atcacctgc tcgtcgccga 31560
tctctacac catccctgcc atctccttc cctccactgg ctgctgctgc acctgtcagc 31620
tagggcgggc atggcgcgcc gcgccgttc ccgcgtgct ggccgccctt gctcggagg 31680
ctcgatcaa gggcgagggg gccgcgcggg gggcagtggc ggtggcgcgg aggacgcag 31740
ccacgtgttc gacgaattgc tccgtcgtgg cataccagat gtcttctct acaatattct 31800
tctcaacggg ctgtgtgatg agaacagaag ccaagaagct ctcgagctac tgcacataat 31860
ggctgatgat ggaggtgact gccacactga tgtggtgtcg tacagcacg tcatcaatgg 31920
cttcttcaag gaggggatc tggacaaaac ttacagtaca tacaatgaaa tgcttgacca 31980
gaggatttcg ccaaatgttg tgacctaca ctctattatt gctgcgtat gcaaggctca 32040
aactgtggac aaggccatgg aggtacttac caccatggtt aagagtgggt tcatgcctga 32100
ttgcatgaca tataatagta ttgtgcatgg gttttgctct tcagggcagc cgaaagaggc 32160
tattgtattt ctcaaaaaga tgcgcagtga tgggtgtcgaa ccagatgttg ttacttataa 32220

ctcgctcatg gattatcttt gcaagaacgg aagatgcacg gaagcaagaa agatTTTTga 32280
ttctatgacc aagaggggcc taaagcctga aattactacc tatggtaccc tgcttcaggg 32340
gtatgctacc aaaggagccc ttgttgagat gcatggtctc ttggatttga tggtagaaa 32400
cggatatccac cctaatacatt atgttttcag cattctagta tgtgcatacg ctaaacaaga 32460
gaaagtagaa gaggcaatgc ttgtgttcag caaatgagg cagcaaggat tgaatccgaa 32520
tgcagtgcag tatggagcag ttataggcat actttgcaag tcaggcagag tagaagatgc 32580
tatgctttat tttaggcaga tgatcgatga aggactaagc cctggcaaca ttgtttataa 32640
ctccctaatt catggtttgt gcacctgtaa caaatgggag agagctgaag agttaattct 32700
tgaaatgttg gatcgaggca tctgtctgaa cactattttc ttttaattcaa taattgacag 32760
tcattgcaaa gaaggaggagg ttatagaatc tgaaaaactc tttagacctga tggtagctat 32820
tgggtgtgaag cccgatatca ttacgtacag tactctcatc gatggatatt gcttggcagg 32880
taagatggat gaagcaacga agttacttgc cagcatggtc tcagttggaa tgaaacctga 32940
ttgtgttaca tatagtactt tgattaatgg ctactgtaaa attagcagga tgaaagatgc 33000
gtagttctt tttagggaga tggagagcag tgggtgttagt cctgatatta ttacgtataa 33060
tataattctg caaggtttat ttcaaaccag aagaactgct gctgcaaaag aactctatgt 33120
cgggattacc aaaagtggaa ggcagcttga acttagcaca tacaacataa tccttcatgg 33180
actttgcaaa aacaaactca ctgatgatgc acttcggatg tttcagaacc tatgtttgat 33240
ggatttgaag cttgaggcta ggactttcaa cattatgatt gatgcattgc ttaaagttgg 33300
cagaaatgat gaagccaagg atttgtttgt tgctttctcg tctaacggtt tagtgccgaa 33360
ttattggacg tacaggttga tggctgaaaa tattatagga caggggttgc tagaagaatt 33420
ggatcaactc tttctttcaa tggaggacaa tggctgtact gttgactctg gcatgctaaa 33480
tttcattgtt agggaaactgt tgcagagagg tgagataacc agggctggca cttaccttc 33540
catgattgat gagaagcact tttccctcga agcatccact gcttccttgt ttatagatct 33600
tttgtctggg ggaaaatata aagaatatca tagatttctc cctgaaaaat acaagtcctt 33660
tatagaatct ttgagctgct gaagcatttt gcagctttga aattctgtgt tggaattctt 33720
ttctcctaca gtccgattag aggagggatc ttctctgtat gtgtaaatag cgaggtatgt 33780
atgtcacctc tccgaattat tttagctgtg gttcctggac tgtaacaag ctattatctt 33840
ctggtgttga tgccagaaaa aacacaaaag tttgtcgta tctctactaa cggatcataa 33900
aggggtttgt aactggagtt tcaaacttaa ggtatctagg cagtaggtat atattgatcc 33960

tacatcttat gatcttaaga tgatatcctt ctcattatcc tctgctgaaa ctttagcttg 34020
aaccgtcac tacaccacaa tttgagcccc ttagcacaga gcacaacgag caatagcttg 34080
cccttacgtt cattatcttag catgcactac tactaactac ccaataatca atacatcggt 34140
tattaaactg tttgtacagt ttaataatgt cattttatca cgttaacata tgtttcattc 34200
aacaccacac cggttttggc acagttgcaa acttgcaata acattttttac tacttctccg 34260
ccccataata taacaatctc gttccatact atattgctat attacaggat ggatgaagta 34320
cttcttttct tccaaaatat aagaatctag tactagatta gatattatct ggattcacga 34380
atttgattag gctgtctaga tttgtagtcg tatgtaatgt ctaattcggg aataggttat 34440
tacctctttg gatggaggga gtagttttta tttcgtactc cctccgtttc atattataag 34500
ttgttttgac ttttttctta gtcaaatttt attgagtttg attaaattta tagaaaaaaa 34560
ttagcaacat ttaagcacca cattagtttc attaaatgta gcatggaata tatttttata 34620
atatgtttgt tttttattaa aatgctacta tatttttcta taaatgtagt caaatttaaa 34680
gaagtttgat tatgaaaaaa tcaaaatgac atataatatg aaactgagga tgtagcagac 34740
tatagcaaat ttaaactatg cttttatctt agagcatcac caaaagatta gcaataattt 34800
atccctaaaa ttcaagtttt gggtttctta aactgaaaat aggaagtga aaatcttttc 34860
cgtccaagag atagcctaaa tcttatctta actaattaaa atattcataa ttttcctttc 34920
gtcacattaa attttcgtcc gtaaactctga ttgaaatcca attggacaat ccaaaaaata 34980
gagaaaaaga acagaaaaaa taataaaaag cacacaaatc ttatctcaat cccgcgggaa 35040
gctgccgacg ccgccgaatc cgctcgagcg ccgccgccgc cgctcacggg gaacgatgtc 35100
gctgctgtcg cacgcggtat gggaggcgcg cgctgccact gcttgggaga taggatatgg 35160
agagagaagg aaatgtgagg gttagggtta ggtttttccc cgtccgtatc ttcagcgaca 35220
cggaggcgat ccaagctgtc catcagatcg gacggctcag aatgcctcca tcgtcgggcc 35280
gcgcatgctt gatgggcccga gggaaggccg gagggctgaa caaacgcaat caaaggagga 35340
gttggaggag gtaaattaga atttatttgc gggctgagat agtaaattga ctgaaaatgg 35400
cccatagaga aattgggaat tttattttaa taaatgttga aaagggtgtt atattatcaa 35460
aattaaaaat taagctccga aaattctaaa aaatattcaa agagcattat taatcatggt 35520
taatttaata aaaattaaat ccaaccatat catattatct cacggcgcgcg ggtaggaaaa 35580
tgccgagctg ttgtcgttta cggtagggaga gaaggacat tgtttatctc cagaactatc 35640
ttttataact ccatgggaac tttaaaataa atataatcat tattatagca ttagtttttt 35700

tctgtctttt ttttcccaa gagcgccgcg cagaagagat cgatcgcat ctccctgccc 35760
cgacgtcgcc ggccgatctc tcattctctc cagccctgc tcgtcgccga tctcctacac 35820
catccctgcc atctcctcct tcccctcccc tctatcctcc actggtgccg cccacctctc 35880
cgtataagac aaactgcgtt gcggcggttg tttccgccgg cgctgctgct gcacctgtca 35940
gctagggcag gcatggcgcg ccgcgccgct tcccgcgctg ttggcgccct tcgctcggac 36000
ggctcgatcc aaggcgagg aggcgcgcg gggggcagtg gcgccgagga cgcacgccac 36060
gtgttcgagg aattgctccg gcgtggcagg gggcctcga tctacggctt gaaccgcgcc 36120
ctcgccgacg tcgcgctca cagccccgcg gccgcctgt cccgctacaa ccgcatggcc 36180
cgagccggcg ccggcaaggt aactcccacc gtgcacacct atggcattct catcggttgc 36240
tgctgccgcg cgggcgctt ggacctcgtt ttcgcgccct tgggcaatgt cgtcaagaag 36300
ggatttagag tggaagccat cacttcact cctctgctca agggcctctg tgccgacaag 36360
aggacgagcg acgcaatgga catagtgtc cgcagaatga ccgagctcag ctgcatgcca 36420
gatgttttct cctgcacat tcttctcaag ggtctgtgtg atgagaacag aagccaagaa 36480
gctctcgagc tgctgcacat gatggctgat gatcgaggag gaggtagcgc acctgatgtg 36540
gtgtcgtata ccactgtcat caatggcttc ttcaaagagg gggattcaga caaagcttac 36600
agtacatacc atgaaatgct tgatcggagg atttcaccag atgttgtgac ttacagctct 36660
attattgctg cgttatgcaa gggtaagct atggacaaag ccatggaggt acttaccacg 36720
atggttaaga atgggtgcat gcctaattgc atgacataata atagtattct gcatggatat 36780
tgctcttcag agcagccgaa agaggctatt ggatttctca aaaagatgcg cagtgatggt 36840
gtcgaaccag atgttgttac ttataactcg ctcatggatt atctttgcaa gaacggaaga 36900
tccaccgaag ctagaaagat ttttgattct atgaccaaga ggggcctaga gcctgatatt 36960
gctacctatt gtaccctgct tcaggggtat gctaccaaag gagcccttgt tgagatgcat 37020
gctctcttgg atttgatgg acgaaacggc atccaccctg atcatcatgt attcaacatt 37080
ctaatatgtg catacgctaa acaagagaaa gtagatgagg caatgcttgt attcagcaaa 37140
atgaggcagc atggattgaa tccgaatgta gtgacgtatg gagcagttat aggcatactt 37200
tgcaagtcag gcagtgtaga cgatgctatg ctttattttg agcagatgat cgatgaagga 37260
ctaacccta acattattgt gtatacctcc ctaaticata gtctctgtat ctttgacaaa 37320
tgggacaagg ctgaagagtt aattcttgaa atgttggatc gaggcattctg tctgaacact 37380
attttcttta attcaataat tcacagtcac tgcaaagaag ggagggttat agaacttgaa 37440

aaactctttg acctgatggt acgtattggt gtgaagccca atgtcattac gtacagtact 37500
ctcatcgatg gatattgctt ggcaggtaag atggatgaag caacgaagtt actctccagc 37560
atgttctcag ttggaatgaa acctgattgt gttacatata atactttgat taatggctac 37620
tgtagagtta gcaggatgga tgacgcatta gctcttttca aagagatggt gagcagtgg 37680
gttagtccta atattattac gtataacata attctgcaag gtttatttca taccagaaga 37740
actgctgctg caaaagaact ctatgtcggg attacaaaa gtggaacgca gcttgaactt 37800
agcacataca acataatcct tcatgggctt tgcaaaaaca atctcactga cgaggcactt 37860
cgaatgtttc agaacctatg tttagcggat ttacagctgg agactaggac ttttaacatt 37920
atgattgggtg cattgcttaa agttggcaga aatgatgaag ccaaggattt gtttgcagct 37980
ctctcggcta acggtttagt gccagatgtt aggacctaca gtttaatggc agaaaatctt 38040
atagagcagg ggttgctaga agaattggat gatctatttc tttcaatgga ggagaatggc 38100
tgtactgcca actcccgcat gctaaattcc attgttagga aactgttaca gaggggtgat 38160
ataaccaggg ctggcactta cttttccatg attgatgaga agcacttttc cctcgaagca 38220
tccactgctt ccttgttata gatcttttgt ctgggggaaa atatcaagaa tatcatagat 38280
ttctccctga aaaatacaag tcctttatag aatctttgag ctgctgaagc attttgcagc 38340
tttgaaattc tgtgttgga tttttttctc ctacagtccg attagaggag ggatcttctc 38400
tgtatgtgta aatagcgagg tatgtatgtc acctctccga attattttga ctgtggttcc 38460
tggactgtaa acaagctatt atcttctggt gttgatgcca gaaaaaacac aaaagtttgt 38520
cgttatctct actaacggat cataaagggg ttgttaactg gagtttcaaa cttaaggat 38580
ctaggcagta gttttgacat tagatccaac attgtgtagt attcatttgt gtgtatcaat 38640
ctatagggtt tcattaaatt tcatttgtgt actgtttagg tgttgaatat attgttttac 38700
ttgtttttta actgaacaaa agatagctga agctttgttc tttaccaa atgcagtagtga 38760
tcatcacaat atattttttt acggaacagg agattgtata aaatggtttc catcggcggc 38820
caacggcgac cgctctgctc tgaccaccca ccaatccat ccatccactc gccgccgccc 38880
ctgatccaag cctccgccgc gcgacagcga cgcaccgccg tcgagaggag gaggcgtgag 38940
ccccatgggg accctcctcc ggccgcgtaa tgccgctgca cggtaaccaac gcgcctctcg 39000
aggcctccgc cgctagctga tctcttctca tcctgtttgg gtttgggttt gtgatttggg 39060
tgttttttcc gcagcgggtg tggtggtggt gggtgcggcg ggagggggcg gtggccgcgg 39120
ccgtggcggtg gagtgccagc tgcatcggtt gcaccgccgc cggggtccgc aggttgtggt 39180

ggcgacggcg agctgaggag gcgaggagg actggtgagg gacacaggca ggcaggctct 39240
caaggctaag cttgttacag gtactgagac tagttactaa ttactttgat aatcagtata 39300
aataagcttg tgtagtgtaa tggcattgtg ctttctgca cttgtaaatt ttacagaaga 39360
tggtcattca atttgaacct gcatctaata ttttagtggt ttgagtttat tctcccagtc 39420
acagagttga agaggcaagt aacctgtaag agaggactga acattaacac ctcttgttcg 39480
attaaaaatg accaaagagc atcaaacatg tattcgaggc tgttacttta atatggccca 39540
ttaatttggt tagttggcta tgtacatcct agttgggtgca gtgttggtgga aaacggaata 39600
cggtgtcgg atggacgagg tgccgtcaag cgattaatcg taatacggat gattaaacgg 39660
aattatatgg atttttggcg ttcgactaa gatgtacata attgatgta atggcaatgg 39720
tgagacaaa atgcatcatc ttaataaaaa atatttgtat aaatctctaa ctatattatg 39780
aaaatgccat ttattagttc aatagatc aacactgatg gttagtagcg caatagcatt 39840
gggcttgta gtcaaatag tgcagctggg ctgcaagttg caagtttatg ttagtttcat 39900
aaacagacat ctgatttgtc gataaataac cgactaatcg tgccatacaa ctgtataatt 39960
actctgaaat agtaatgttg ctccgacttg atgatacggc acggtctggc taccgtttcc 40020
gttttgacag acgattaaac ggctgtgccg gtcgacttcc acaacactga gttggtgtaa 40080
atgccagtta ccatttctat gatctaaaat aatcaactct tttagtatat tttcaaaaac 40140
gaaaattcag tacacatgca tgaatcttaa tcttcatatc tagctcgta caaatcaac 40200
aaaggcaccg tgtcagctgg tgcacattag ctagttcgta cttagcatta tccactagca 40260
ccttattttc atgcatatca tgctaatttg cttgccacg ttgagtggga atttttttcc 40320
atgttttata atttatatat gttctagact tctacttcat gttcctgagc ctctagtatg 40380
gctggtagca gactaggtgc tgaatgctgt ccttttttgc agactgaaga gaggagaaat 40440
acaagactgt ccgttggttag tcagatttgt aaaaatagac actgatgtag tttatttttg 40500
cccctatitt atatttaaca atacaaatat ataacgtatc ctaagaattt atcgtaattt 40560
aggagaagtt gctcgtttca ttaaattaaa ttgggaagta aaaatgtgtg ctcgagtatg 40620
tcaatgcaat cctgtgttct tgtttgaaga tatggtgtag ggcaggccag gattgaacac 40680
tgaatggtaa gactgcttct gctttcagac gttattgcta aatttttagc tagttgcaat 40740
tagtgctgtc acgccgatta agcagtagaa caaagtaatt ttgtcgtgac aaatgagtta 40800
tatttctttg aaaatcgaag cgaaaacgaa ccaaaagata gaagaaaagg gaaacttggt 40860
aattactcca caaagagaac aaatttattg gtaagatttg atatgagatg ctcgattact 40920

tggcttaagt taacaatatc aaatttgggg aagcaccaaa agaattattg tgacttaagt 40980
taaagatatc aaatttgggg aagcaccaaa ggaattattg tgatggagtt gtgggtgcat 41040
aacgttattt gctttgttca aatcctagtg actatgaata tgaatattaa tgcgtaaggt 41100
aaggaattta ttgttaattt taggttcttt acgatttgtt cgggggacgc cattcggtaa 41160
ctgtaataat gttttgtatt ggattcactt gtgttacatg cagcactaa acatgtgctt 41220
taccttttca tttgtttgtg cgttctgcgt ttgaatttga cgagattcca tggtcagctc 41280
aacatgtcag ttactgcgtg tcaagcagtt actgcgtgtc aagcgatctt atatggtatg 41340
cgcacaagcg attgtatacg gatatgacag tataacgtgt gatattgatt tttttatata 41400
aaaaaatacg atgttacttt ctttcataaa ggaacaaaga cttttttttt aaaaaaaga 41460
aggggtatta ctaaaaacaa aaatgtcaaa aacaaaatat cagtgcacat ggcaagtgtg 41520
ctcggcaatt ttttgtctgt actttaacaa aaaatatctc tatatggtat tttttacaag 41580
ggtgtcacaa atatttttaa ttagccaaac atctgcattt tattaaaaac tgtataaatt 41640
ataatttata ctctaaaagg ttgtgtacat ctctcttga gaaaatgtat aagttgcgaa 41700
caaacattaa tccacgttat ataagtcaat ctgttattta accatagaaa gtaagaaacc 41760
tactagcgtg ttaagctaag ctctctttca ttctctttct tcttcttggg tttgcttcaa 41820
tcacttgtca agtgaagggt tcttaactac cttactcct actcaccaa ttttttctc 41880
agatctttcg taggtatata ttgatectac atcttatgat ctttaagatga tatccttctc 41940
attatcctct gctgaaactt tagcttgaac cgtcatctac accacaattt gagcccccta 42000
gcacagagca caacgagcaa tagcttgccc ttacgttcat tatttagcat gcactactac 42060
taactacca ataatacaata catcggttat taaactgttt gtacagttaa ataatgtcat 42120
tttatcacgt taacatatgt ttcatccaac accacaccgg ttttggcaca gttgcaaact 42180
tgcaataaca tttttactac ttctccacc cataatata caatctcggt ccatactaga 42240
ttgctatatt acgggacgga tgaagtactt ctttccttcc aaaatataag aatatagtac 42300
tagattagat attatttggg ttcacgaatt tgattaggct atctagattt gtagtcgtac 42360
gtaatgtcta attcggtaat aggttattac ctctttggat ggaggagta gtttttattt 42420
cgtactcct cgtttcata ttataagttg tttgacttt tttcttagtc aaattttatt 42480
gagtttgact aaatttatag aaaaaatta gcaacattta agcaccacat tagtttcatt 42540
aaatgtagca tggaatatat ttttataata tgtttgttt tttattaaaa tgctactata 42600
tttttctata aatgtagcca aatttaaaga agtttgatta cgaaaaaaa tcaaatgac 42660

atataatatg aaactgagga ttagcagac tatagcaa ttaaactatg cttttat tttt 42720
agagcatcac caaaagatta gcaataat ttcctaaaa ttcaagtttt gggtttctta 42780
aactgaaaat aggaagtga aaatcttttc cgtccaagag atagcctaaa tcttatctta 42840
actaattaaa atattcataa ttttcctttc gtcacattaa attttcgtcc gtaaattccga 42900
ttgaaatcca attggacaat ccaaaaaata gagaaaaaga acagaaaaaa taataaaaag 42960
cacacaaatc ttatctcaat cccgcgggaa gctgccgacg ccgccgaatc cgctcgagcg 43020
ccgccgccgc cgccgccgct cacggggaac gatgtcgtc ctgtcgcacg cggatatggga 43080
gggcgccgcc gccgctgctt gggagatagg atatggagag agaaggaaat gtgaggagg 43140
gttaggtttt tccccatccg tatcttcagc gacacggagg cgatccaagc tgtccatcag 43200
atcggacggc tcagaacgcc tccatcgtca ggccgcgcac gcttgatggg ccgagggaag 43260
gccggagggt cgaacaaacg cagtcagagg aggagttaga ggaggtaaag tagaatttat 43320
ttgcgggctg agatagtaaa tggactgaaa atggcccata gagaaattgg gaattttatt 43380
taaataaatg ttgaaaaggt gtttatatta tcaaaattag aaattaagct ccgaaaattt 43440
taaaaaatat tcaaagagca ttattaatca tgattaat taaaaaatt aaatccaacc 43500
atatcatatt atttcacggc gcacggtagg aaaatgcgca gctgttgtc ctgacgggtg 43560
gagagaagg acattgttta tttccagaac tatcttttat aactcccatg gaactttaaa 43620
ataaatataa tcattattat agcattagtt ttttctgtc tttttttcc ccaagagcgc 43680
cgcgcagaag agatcgatc cgatctccct gcccgcacgt cgccggccga tctctcatc 43740
tctccacgcc ctgctcgtc cgatctcct acaccatccc tgccatctc tcttccct 43800
cccctctatc ctccactggt gccgccacc tctccgtata agacaaactg cgttgccgcg 43860
ttggtttccg ccggcgctgc tgctgcacct gtcagctagg gcgggcatgg cgcgccgcgc 43920
cgcttcccgc gctgttggcg cccttcgtc ggacggctc atccaagggc gaggaggccg 43980
cgccgggggc agtggcgcg aggacgcac ccacgtgtt gacgaattgc tccgccgtg 44040
caggggcgcc tcgatctac gcttgaacc gcacctgcc gacgtcgcg gtgacagccc 44100
cgccggccgc gtgtcccgct acaaccgcac gcccgcagc ggccgcgac aggtactcc 44160
cgacttgtc acctacggca ttctcatcgg ttgctgtgc cgcgcgggcc gcttggacct 44220
cggtttcgc gccttgggca atgtcattaa gaaggattt agagtggac ccatcgcctt 44280
cactcctctg ctcaagggcc tctgtgccga caagaggac agcgacgcaa tggacatagt 44340
gctccgcaga atgaccgagc tcggctgcat accaaatgtc ttctctaca atattcttct 44400

caaggggctg tgtgatgaga acagaagcca agaagctctc gagctgctgc acatgatggc 44460
tgatgatcga ggaggaggta gccacactga tgtggtgtcg tataccactg tcatcaatgg 44520
cttcttcaaa gagggggatt cagacaaagc ttacagtaca taccatgaaa tgctggaccg 44580
ggggatttta cctgatgttg tgacctaaa ctctattatt gctgcgttat gcaaggctca 44640
agctatggac aaagccatgg aggtacttaa caccatgggtt aagaatgggtg tcatgcctga 44700
ttgcatgaca tataatagta ttctgcatgg atattgctct tcagggcagc cgaaagaggc 44760
tattggattt ctcaaaaaga tgcgcagtga tgggtgtcgaa ccagatgttg ttacttatag 44820
cttgctcatg gattatcttt gcaagaacgg aagatgcatg gaagctagaa agattttcga 44880
ttctatgacc aagagggggcc taaagcctga aattactacc tatggtaccc tgcttcaggg 44940
gtatgctacc aaaggagccc ttgttgagat gcatggctctc ttggatttga tggtagaaa 45000
cggtatccac cctgatcatt atgttttcag cattctaata tgtgcatacg ctaaacaagg 45060
gaaagtagat caggcaatgc ttgtgttcag caaaatgagg cagcaaggat tgaatccgaa 45120
tgcagtgcag tatggagcag ttataggcat actttgcaag tcaggcagag tagaagatgc 45180
tatgctttat tttaggcaga tgatcgatga aggactaagc cctggcaaca ttgtttataa 45240
ctccctaatt catggtttgt gcacctgtaa caaatgggag agggctgaag agttaattct 45300
tgaaatgttg gatcgaggca tctgtctgaa cactattttc ttttaattcaa taattgacag 45360
tcattgcaaa gaaggagggg ttatagaatc tgaaaaactc tttgagctga tggtagctat 45420
tgggtgtgaag cccaatgtca ttacctaaa tactcttatac aatggatatt gcttggcagg 45480
taagatggat gaagcaatga agttactttc tggcatgggtc tcagttgggt tgaacctaa 45540
tactgttact tatagcactt tgattaatgg ctactgcaaa attagtagga tggaagacgc 45600
gttagttctt ttttaaggaga tggagagcag tgggtgttagt cctgatatta ttacgtataa 45660
cataattctg caaggtttat ttcaaaccag aagaactgct gctgcaaaag aactctatgt 45720
taggattacc gaaagtggaa cgcagattga acttagcaca tacaacataa tccttcatgg 45780
actttgcaaa acaaaactca ctgatgatgc acttcagatg tttcagaacc tatgtttgat 45840
ggatttgaag cttgaggcta ggactttcaa cattatgatt gatgcattgc ttaaagttgg 45900
cagaaatgat gaagccaagg atttgtttgt tgctttctcg tctaacggtt tagtgccgaa 45960
ttattggacg tacaggttga tggctgaaaa tattatagga caggggttgc tagaagaatt 46020
ggatcaactc tttctttcaa tggaggacaa tggctgtact gttgactctg gcatgctaaa 46080
tttcattgtt aggaactgtg tgcagagagg tgagataacc agggctggca cttacctttc 46140

catgattgat gagaagcact tttccctcga agcatccact gcttccttgt ttatagatct 46200
tttgtctggg ggaaaatata aagaatatta taggtttctc cctgaaaaat acaagtcctt 46260
tatagaatct ttgagctgct gaagcatttt gcagctttga aattctgtgt tggaattctt 46320
ttctcctaca gtcctattag aggagggatc ttctctgtat gtgtaaatac cgaggtatgt 46380
atgccacctc tccgaattat ttttactgtg gttcctagac tgtaaacaag caattatgtt 46440
atgctgttga tgccagaaaa aacataaaag ttgtcgtta tctctactaa cggatcataa 46500
agggatttgt gactggagtt tcaaacttaa tgtgtctagg cagtaatttt gacattagat 46560
ccaaaacaat ttataggggt tcattaaatt tcatctatgt gtactgttta ggtgttgaat 46620
agtttgactt gttttttaac tgaacaaaag atatgtctga agctttgttc ttaccaaaat 46680
gcagtactga tcatcacaat atatttttta tggaacaaga ttggattgta tagaatggtt 46740
tctgatctga ttatcttata tcaacgtatt attatgcaca tgtactaatc atgaaatata 46800
tgatggaatg atgtttctat ttacctgtgt gaggcagcaa ggagttagat ggataacacc 46860
acatactccc tctgtcccag aatataagaa gttttagagt tggacacgat tattaagaaa 46920
gtaggtagaa gtgagtagtg gagggttgtg attgcatgag tagtggaggt aggtgggaaa 46980
agtgaatggt ggagggttgt gattggttgg gaagagaatg ttggtagaga agttgttata 47040
ttttggggag tacattatta ttctagaaca atactgttgt gctcaagaag cgttccaaag 47100
atgtttcaca acctgtgctc gatgggtttt gagcttaata ctgggacatt cagtatcatg 47160
atctgtctca ttcttaaaaca tggaataaag gatgacagca tgatttcttt gtctctataa 47220
tcttttggct acccacagat aatagctgta aatctatact actttaaaag gagtagtggt 47280
ggtggtgagt ggtgaatctg ccaccacccc accaccaact ctcaaaattc tgacatgtgg 47340
gatcactgtc aatcccttct ccaagacatg tgggatcact gtcaatccct tctccaaacc 47400
aattgtatga tagaacagtg gaaatcacgg acagaccatg gagctctcaa ccataatcat 47460
ccttgcgagt taataacaaa tggagcgtaa acttggaag caaaaaactc aaattaattc 47520
taaaattaag ctctaggatt caaaatagat ttctctctg cattgtgctg ttatgatttt 47580
taattccgta acaacgcaaa tgcattttgc tagtcttata aagaagggtt aatgcaaata 47640
ttctgattaa atgattgtat ctatgaagtt tgaatgctag tggaagctcc tttgacctg 47700
ttttgttgtg cgagcattta agagagtga gagaatgctt ctttggtgct gttctggtat 47760
ggaaggatcc acagataaaa ttcaggttct actgcttctc tgcttgtaat tttcatgaag 47820
ctgcagtga taccttggtg accacttgat ctgttgcttt gaaggagaat atagtagtgg 47880

ccaaggttgg tgacggtgat ggtggcatgt gatccccag atcttcagt acccagagag 47940
gaggggacgg cgcgtggtga gctacaaggc atactcagt gagggcaaga tcaaggcctc 48000
ccgtccgtag gggactccgc tgcataagg ccaactgctc cgaactgatc aatttctggt 48060
acggatcact tctcctttcc ttttttttt caccctaagc actctcttga ttcttcgctg 48120
ctacctccct taattttctt caatatattg tggcacttga tcatggcgga gaccacctt 48180
ccagtgtgaa tggattttgt caaagaacta aatttattcc attagcttat tttccgatta 48240
catggaagac attcttttct ggaataaata cagaactaaa tcctgtttcc tgaataaaaag 48300
ttgttagtgt gtggcatggt gcatttcgc gcttctaaat ttataaaaac ctgttcattc 48360
aatttgaacc tgcataccat ccaatatatt aggtgcagac aggtgcttgc ggtcagggtta 48420
aagaagttgg caaaaatgct tctgaagaaa ggtaattgt tgtttcatct caggaggtaa 48480
tatgcagatg attattccaa ttggcattgc cttgccattt ttatcacgag tctttacaat 48540
tttatatcct cctacatatt ctttcagat tccagatgat ccagtgtctc caacaattga 48600
ggcgcttatt ttgtccata gtaaagtaag tacacttgct gagaaccacc agttgacaac 48660
acggcttggt gtaccatcaa acaaagttgg ttgtattctt ggggaaggtg gaaaggtaat 48720
tactgaaatg agaagacgga ctggggctga aatccgagtc tactcaaaag cagataaacc 48780
taagtacctg tcttttgatg aggagcttgt gcaggtaatt tatttgcca tacctacacc 48840
agagatccat atattacttt tataactgca gtttttactt gttaacattt cattgtgctt 48900
ttacatttgt tccaagcttt caggttgctg ggcttcagc tattgaaaga ggagccctga 48960
cagagattgc ttcgaggctt tgaactagga cactcagaga tggaagttct tccaataatc 49020
cgacaccttt tgcccctggt gatggtcctc ctgttgatat cttgcctaac aaggaattca 49080
tgctatatgg acgatctgct aatagtcctc catatggagg gcctgctaata gatccaccat 49140
atggaagacc tgccattgat ccacatattg gaagaccaat atccacaata tggaagacct 49200
gccaatgatc caccatatag aagacctgtc aatgatacat catattgagg gttgaacaat 49260
gatgggcctc gtgatcaggc ccggtcctga ggggggtcga atggggcgat cgctccgggc 49320
ccccgattc ccaggggccc cactatctg tgcaacgagt agtagcgatc ttccagcgcg 49380
caacgtgagg cgatgtttct ccgtgatttc gccggcctgc aactgcgaga tcgcgagtat 49440
aacgatcagc cgatcgatct catctgccga ctgcatgct gatgccacac gcaagcgag 49500
catatcagcc ttatcttggt tgatcgcat gctggacgag cacatctgtt gtcgcatcaa 49560
ctgctgactg ctatatatgt gctggtgctg aatcgatcga ttgtcgtcac ggaagtgaag 49620

aacaaccacg gcactgctgc ctgctgggct ctagccgcc a tcagtaagta cgctatactg 49680
cctatctaga tctagatcga gattacatag tggaattatc tgtttataac aaaattacaa 49740
ggtatcaatt gataatttaa ggttataacc gtacaaactt cagtgatttg ctggtttcac 49800
attgggtaga tttgtttcaa ctaatttggg acttctgtag ccttgtaatt tacgaatcta 49860
gtattaatat tttcttaagt attagcctgt tccttgatat tatgctgttg agaaagtatg 49920
caatagataa caaaaacaag taggtgtgtt gaggatgctc aagagtaata caggcacttc 49980
aataattctg atattatcag gacatcatca ataattctgc gcctacaaat cttcaaagaa 50040
aatTTtaata taatgcgtat gatTTTTtaa atacgaatat tgattgctat ttaaagatat 50100
ttatattata tggttaattat tatttgaagg tttataataa aggcctccgt ttttagtttc 50160
acgctgggcc ttcagaatct caggaccggc cctgctcatg atccttacac cgtgtatcct 50220
gtagagtact tctctaaaag agagtacct agtggaaagta gcaaagttgc accatctgct 50280
tcatacgaaa gatatgcagc aactactcgc ttgcctaata gagaactgcc ctcatctatt 50340
agtctgggtg ccgattatat gtcctgccgt tcttatcttg accaagtacc tactgatagg 50400
tactctaata gggttacact acaattaggc ctcttgagag ccgggaatag taatgtgcaa 50460
caattaggaa tcaccagagc tggaaattcc aatgcttatg attatactga ggtacatttc 50520
caatgcgtta gcttgccctct tctttgcaa tggccctcgc ctgatatgtt tccattagaa 50580
acatgaaacc atatatttga ctgttgcat t atgtctattt tcttccatga tggttcagac 50640
gtctgaaaaa aggacaaaaa tattctagaa tatgtcatgg tgatccaaat atatccttct 50700
gtcttgtgcc cactctaata tctatcgttg gtaacactat tcaattgtta ccatgttggt 50760
gcaaacccta gattcagtta ttcagctgtt ctctgctgct gttgcttacc agttttctta 50820
gttgggtgtt gatcttttct cattttttat ttccttggtt cctggttcac ctgctgcctc 50880
tctgatgcat ctgaatgat atttttgttc tcttcagtgc ttaatagatt taaatttcat 50940
tcttttcagg ctgcggagct gatccatgga cgtgaggatt accgaagact gtcaggctc 51000
actgggtatg gcttacgcag actgaatttt tacaggacac aaacatgaat tttgtcctca 51060
taatcattga gtgatgatct ctttgcaggt atccagggtg ctctgtcgaa ttgtggattc 51120
caaatagtta actggagtct gtcattgggt ttgggtgggt caatctagct gagatccgtc 51180
tggtatagcg taagagaaac atcatgcact atccccagtc ataaccatgc cccaatggcc 51240
accaatagtt ttcctcgtga aaatctcccc ttgatcccag atctctggtg cgagagttaa 51300
gttgcacgaa gcccatcctg gttcttccga gtccattgtg gagatccagg gcattccgga 51360

tcaagtgaag gccgcacaga gccttctgca aggccttcac gccgcaagca gcaacagcag 51420
gcaggcgccc cagtcctctc gcatggccca ttatttttag taagctggag gacattcgca 51480
acaggggggt cagtgggtcac tgcaaagctg agtttggtct tcagttcaac tgcagaaaat 51540
tgcagatcgg ttgccgtagt tgctagaacg gtacatagtt gccacctaac tgtagcgagt 51600
ggcataactt atttgtgtgt actgcccact gttgtctctc cttgtgttca tggattcaga 51660
cttgtgattg tagtatttct ggatcagact ggagtaaaag aaaaaaaaaa aggaagacat 51720
gggtttaaca gtaagctcaa aacgttgaca gtagtaaaat aaaaggggtt tgttcacttt 51780
atttccaata tcaaccttac caacatttgg cgttgaatca ttataaccac atcgcttggtg 51840
cagctgaatt tggggctgtt taaaagatgg tctcttggtg tgctaattgc ctgcgggcaa 51900
gcgtgggtacc ttgtacaata taaatataat tataactatt taatttcata attaaacatg 51960
ttgttcaaaa tctctactat tataaaaatt gaagatgttt tttgccggtg ttttggtagc 52020
tcatctgtgt atgaatccgt ttttaagttc gtttgctttt ggaaatacat atctgtattt 52080
gattcagttt ataagatcgt tcacttttgg taatacagaa ggaatcatat aagaattctg 52140
tttaaaaaca ctcttatagt aacttgagac gatcagacgc ctaactacag ctcatgattt 52200
tctaaatata tatatatata tatatatata tactagaaaa aatatatgtg tgttaaaagc 52260
tatcttaate ttattattgt tatatatatt agttaacaag aaatctattg tgggaacttg 52320
tttggatata tattttttta aaaaaaatca tgagctgcaa ttaggaatcc aatcgtctca 52380
agtttagcagg agggcgagtt tttttaaaga gatttcttat acgatttctt ctatatttct 52440
aaaagcaaac gaacttaaaa accgactcaa acatggatct gtatttccaa aaacgaataa 52500
acttaaaaac cgactcatgc acagatgatt aatttttata atagtagaga taaacgaact 52560
cccacagtga attttatttt aactgaacca tataacaata ataagattaa aatagacttc 52620
accggttgca atgcacgggc attttttcta gttaaagaag aaataaaaaa acacaaaaat 52680
ttataaaatg taaaaaagaa aaatattata attttgtag aattattatt ataatataga 52740
aaaatagttg caaaatttc tcaacgaatg tcgaataaac tcagcaatgt catatattta 52800
aatatgatgg taatatttgt tcgcaaaact ttaatcttca atccttcaac aacatagata 52860
tacaacgtcg taatcgccaa caagcccagag tgaccataca ggatagccga gcggtggatc 52920
tgtactgttc ttgggtgaaa taaatctagt acattgtata tcttatctta atatctacta 52980
ttataaaaat tgaagatatt tcttcaaaga ttccatacg ttctctactc cgttacaata 53040
tcggttctac tccgttacaa tatcggtttt gtacaccccg cgcacgcgtt gtgtgttctc 53100

cogttccaat acatgaagct agagtcttgc ttctccctgg tctggcaggc cctttttcca 53160
ccatccccac cagggccagc gggttacatt gaccgatcac ggcccacatt agtggatgca 53220
gccagccacg ctcttcacaa atcatgtgat gaacattagc tgagttaaaa ttatccttt 53280
gatgattggt agaaatgttt tttctccac atcttctctt tcaattttgg aaaaatagat 53340
ttcttgattt ttgtgctcgt acatcactaa taaatcagtt gttacccttc cacacattgt 53400
caatttacca tgtctatttc agctcttacc ttgtatagtc ttgactcttg agtcctcgt 53460
attgactaag ttgtacatg cctcctacaa atcaatagac tgccataaca atattttcta 53520
cgacatgac catattagtc catgcaatgc aagtacacac aactactgc acgaaaaaac 53580
tatgcacat aacttcaaaa ctaacatgtt agaatgacgt taatttttca ttacaattat 53640
attcatcgac cgttaattta ctaggcatcc tgtttaaaaa aaatattcac cgaccatacc 53700
cacatgttcc gtagttcatt aggtgatgga tcggtagtta cagcagctgg atttttatat 53760
tttggtcatt ttgaaaaatt tatttcgcaa atagactcct gaaaaaactt atcccagaaa 53820
tagtcccttt tggagcgtca gagtggctgg cgccgtggtc caacgggaca gcgccaacct 53880
ctctggcgcc gcccccgcc tctattcttg tttctctata tagagttgca aactttttat 53940
ttttgtttta ttttttggga tgttttttca ctcttagaat cacgatacaa ccaactacaa 54000
aaaaaattaa actcgaacgg aatatatcac ttagctagaa gtctgaaaat atagcatacc 54060
acttatctac ttgacactt caccaaaatt agaccataac ttcttttagta aaatcctttg 54120
atcagcatat taaacataat gcaactctat actagggtgaa attacttaat ctaattcaaa 54180
atataactac atgtagcctt gaaaaattct acatgccaca tatttcgtcc gtttgagttt 54240
attattttta tggttcgttc atgtgagttc ccaagtgtga aaaaaaata aaataaaaat 54300
aaaaaagttg cacatcctct cctctgcatt agagaggaga ggagaggaaa aattctacag 54360
gtcacatatt tcgtccattt gagttcattt tttctatggt tggttcttgt gtgttcctaa 54420
gcgtgaaaaa aatatcaaaa aaataataat aaataaaaaa attcgggggg gggggcgcc 54480
agccactctt aggggtgaaa acgatcgat aatatccgat ccaatctgct ccgaatccat 54540
ccgaaataag gatatggtat gggtttttag aaatctggcg gatatggatg cggatgagga 54600
tatggtatct ccgaaatacg acgattatc cgacattttt gtcggattat ccgataggcc 54660
ctttaccgga taatccgaaa ttatgaacac atgtaaccac tctatctatt gcatataaca 54720
taagttggtc catccaatga cctaattcat caattaccct agatttctta ctatgtggtt 54780
ttcaccattt catgtcacac ttgcgtagct gtatttttat aaaatggaca tcatgtattt 54840

atgttgttta gcacttaagc acataattat tacaatgggt cgtttattga cattgtgtta 54900
tttttacttg cattgctaac tcaatgttgt attgattgca tacacacgta acatctgata 54960
aaatttaatc cgtttctgaa ccgattccgc accatttccg acatctgcat ccgtacacta 55020
tccacacca ctccgaatcc gcttaaaaat atggtttagg atatggtatg accactatcc 55080
gtccgaatcc gctttatttt cacccttagc cactctggcg cgcttcccct gccacctcag 55140
catcgtccca ccacgtcggc agaaggacgg cggtccagc cactctggcg ccacaaaaaa 55200
ggaccatttc tagcataagt ttttttaggg gtctatttac gaaataagtt tttaaaagga 55260
ccaaatgtg aaaaatccag gttacagcag actgtgataa gcaatagcta tattgcctat 55320
atatacacgt atatgcattg ctaatccttc aattttgtcc aattccttta aattgtcttc 55380
acctgttgca acgcatgatt ttttttctag tcttaacctt aactaatctt aataactaac 55440
taaaagattc gtatctttcc gatcgtcacc ttgtccatac gctaattttt cgtccgtccc 55500
ccctccccct caaaaaaaaaa gggaaaaatc cattttacac cctcgaactc ttatgcttgt 55560
ctaaaataca cccccgaact ataaaaccgg gtataataca ccctcgagct atcaataccg 55620
gacagttcaa ggggtgtatta tacctggttt tgtagtttg gggtgtattt tagataagca 55680
taagagttca agggcgtaaa tggacttttc cccaaaaaaa atcccagtcg ttactttcca 55740
tcctgagaat cggagacagg gaaaactgaa gcatacacgc aaatagaatc aaagataggg 55800
aaaactaagc atatacacac aaatatatcc aaaaattccc atgcagctag atcggggtgcc 55860
accgttggtg ccaaaccacc acattgcaat gttaaactaa gactaaagcc taaatcctat 55920
gctaagtcac caaattagac tcggttctac caatttggtg atatatcaa ttagacttga 55980
tttttactga tttgagggtc tcgagggtgc acactatgaa acggaagttt ttcccgttgc 56040
aacgcacggg cactatgcaa tatcttaact aattaaaaga ttcataattt tcctttcgtc 56100
acaccgatct ttcgtccgtc tgtaacatca cgtgcacctc ctctccaaat cccacatcat 56160
cataatccga cccaaaaaca aaatctcaat ctcaatccaa tcagaatcat cacaaaatca 56220
tccaaaatat caagagatga ttataggaga tggaggggtg agcaggagca acatcatcat 56280
cgcataaaaa ccccaaaatc aatcacaca acgacatcat tatcacataa gaaaaacaat 56340
acaaacaaca tacacaatca acaacactgg cggatccagc cgaggggaca acggcgtggc 56400
agcgggcaga tcctctcgtt cagatccgcc cacgggtgcc actgacgtcg ccgccccac 56460
cggatccaag ggagaagctt cggacagagg gagagggggg tagaggaccg ctaaattccgc 56520
ccaccggaat tgccgccgcc accacctccg tcggatttgc ccgagggagc gccgatgccg 56580

ccaccgccat cgcgggagaa gcttgggcac ggagggtgag gaggaggggg ggtagagaat 56640
cgccggatcc atccgctgga aaagcctccg ccggatccgc ctgccggaaa caccggtgtc 56700
gccgcctccg ccggattcgg tagcgggagc cgccgatgcc accaccgccg ccggatccgg 56760
tcggtgggag cactgacac catcgccgc gcctcctctg ctaccgacaa gggagagacg 56820
agaggggcgg gggcgagggc gggggacgag agggttagag ggagggaccg agtgggagag 56880
agagggacga gtgagaggag ggggacgagt gaataaggat gcgtgacctt atccactcgc 56940
gcggtcgcac cccggtcttt tctctcgtc agctgttgcg cttgtggaga ggatgcgaga 57000
tttttttttg agtaaaatgc acgggcggtc cttaaacttg tagcgtctg tcatctaggt 57060
tcccaaactc tcaaaatgca tatccaggtc ctagaatttg tcaaagtgtg tcatctagat 57120
cccaaaccga cacatctctt cttggatcct acatggcgct aatgtgactt gtcacatgga 57180
cgtgacacgt cttttttttt cttcttttct ttttcttttc cgttttcttc tcattcttct 57240
ttttttccat cttctgctcg ggtcacatag aaaggaaaag aaaggaaaat acaagagaag 57300
aaaaaaagaa aaaagaaaat ttttaaattg gtctcattcg tcagtcaaaa ttatgccaca 57360
tcatgtccct gcgacatgcc acatcagcac cacgtagcat cctgaagggg ttgtggcgat 57420
ttgggacctg aatgacacac tatgacaagt tctaggactt ggatatgtat ttgagagtt 57480
taaggattta tatgacacac tactataagt ttaaggaccg cccatgccct ttactttttt 57540
tttttacacg gagagaatgc gaatttggtg gttagttgag gctgagggtt tctcgcacgg 57600
agaaatttgc ggtgggagaa ttttttttcg aggttctttc tattgggaga agacgggatt 57660
atagggatta ttactggtgt ggtggccctt gtttcttttc tttttcgagc ttctttccgt 57720
taaattcact tttctctctt caaggagcgt aggacatgac tgaatgcagc tgctgtaaat 57780
tagaaataaa aaagaaacat attctgtttt tcattttttt caataggtaa atataaagat 57840
ttttaagtaa tatttaaaaa tatatagtgc tgatcaacga cattgttaag tgagattttg 57900
ctgttactat cacttttttt tccattgggc tcacgtacgg cattaaaagt tttagttttg 57960
gttctctcct tttgagtttg ggcatatacc aatattgaga taggtatact aaagttcatt 58020
tggattttat tcgattcaac ttttttgggt tttgttcagt tcttttttac atgtttctca 58080
tctgaaatta ggaaattagg tttggtaaag tcttgaatag ataacgctgt tgacgtttga 58140
acatatattt atctatttat ttatttaaaa atatatgaat aatttttatt ttgttatgac 58200
ttttgtcggg gacatgggac cgggagtatc atgactagag gcttgggcag gagcgatcac 58260
ccacgtggcc tgatgtaaca tctgaaaaat tcccaacaat aaaaatcact aaaattttga 58320

actttttaaa acttttgcac catgctggtt gttatgattg ctattgcttg ccaaaccgta 58380
aatgatcaca aagaaagtaa agtaaggatc taaaatttaa gtaatagata aatttacgag 58440
aatataatat ttaattgcta accctacaaa taattacgca caagaaaaca aagccagaca 58500
aacggaaggt taattactaa tttaaattat ggattaatta ttaaataactt gaaccatgtg 58560
ttgcgtgcca tggcatctaa atacacatga aataatggtc atataattaa attaagcttt 58620
ataaaattat gtgaggtttt aattaagcaa ttagcttaat gttgtaccga gtcttaatat 58680
actatttata gaataaataa attcaaccta tccgtgtaaa atatatgtgct ataagttcat 58740
tcaatgtact attgtaataa taatggccac attaggatat tttaattaat tttggaaccc 58800
tcaaagcctc caaaattatc taggttaatt ttgaaattat acctcattta agtaatgcaa 58860
tagaaaaata tacataaaaa taaaatatgg gtaatattag aaattgagta aattttcatc 58920
taaattaaaa catatatgtg gtaaacctcc tttatgtaaa aattaagatt tatagaatga 58980
aatttgtaca agggataaac taaaatcggg ttaaatagaa aatggcactg ttcattgcac 59040
tctaggtgct cgacgtggtc cctggcccta tttccccct cagccgcgcg cgccgtggtg 59100
cctcgcgccc cgccgacgc caccgcgctc gcgtcgccgc tgcgcgcgcg tcgccgtcgg 59160
ccgttcgcg ccgctcgtcc gtcgtcgcgc cgcccgccgc cccgcgcgcg gtcgtcatcg 59220
cgtcgcgcgc gccatcacgc cgccgtggccg cccctgaccc cgccgcgcgc cgccgcgcgc 59280
cgtagccgcg tgcgcgttcc atcgccgctg ccgcgcgcgc cgccgtcacc gcgcgcgcgt 59340
cgtcgcgcgc gcatagcccc gcgcgcgcgc gccatcgtgt cgccgcgcgc tcgctgcgtc 59400
ctcgagcccc gcatccctct cgagccccgc acgtcgcgctc ttgtcgccgt tgctgcgcgc 59460
tcgtcgtcgc cgatgctgtc gcgtcgccgc tgccgcccgt cgcgctgcct tgcgccccgt 59520
gccgcgcgtg ccgcgttgct gctgtcacct tcggtcccg cctcgtgccg cgccgacccg 59580
ctgcgcgcgc gtcacgccc gtcgtcgcg cgccgcccgc ccgctgccgc gccgtcacgc 59640
tcgtgtcgcc gtcggcctcg cgccctgagc cgccgcgcgc ccgtccctc gcgcctgcgc 59700
cccgcgcac gccggtcccc tcgccgtcgc cctgcgccac tgccgcgcgc ccggtcccat 59760
cgccgcgagc ccggtgccgc cgccgcgcgc gcgtcgcccc gcctgtcacg ccgctcgccg 59820
cctcgagcca cacgcgtcgc gccgtcgct cgccattagg gccggccacc cctttccccg 59880
cgccctataa aacccccgg ccacccccct ttcacccac accatcccca ccattcccc 59940
tcttctctc ctcttcccc tcttgctccc ctccaccgc ccgcgcgcgc gccttcgtgc 60000
cgccgcgcgc tgcgcgtcgc tcgcgcgcgc ctgcgcgcgc cgaccgcgc ccttcgtgcc 60060

gccgcgccgt gcgccgacgt cgtgccgccg tcgccgtcgc cgtcgtcgtg ccgccgtcgc 60120
cgtcgcgcgtc gtcggtaagc cgccgtccct tccctcgttc cgacgccgtc gccgcccggg 60180
tggaaggag cccgagagaga gagggaggaa ggagccggga gtaggaagaa agaaaagaaa 60240
agagagagag agaaaagaaa agagaagaaa agagaaaaga gagaaaagaa aagaaaagag 60300
attagagaag ggagggaaga gtggggcccca cctgtcatta gccccatcca attcccctta 60360
gaaaaataat tctgtagaaa agaaaatcaa gatcttgacc ccacctgtca gtcactatag 60420
cgtgtggata aggttgtatt aaaaataaat gaattaggaa cagtactatt tcgcaactat 60480
tagaattaat tcaaatttga atctttacac tagcataact aattcatttt agtccgatt 60540
tgagtgaac ttgaacctaa attcatctaa attcataagc tttccaatgg tatataattt 60600
actattaaat aaaatatatt tataattatt aagtaattaa tatcatatga ttaggttatg 60660
gtcaacttaa aaatatgcta ataaataaaa ttagtattgt ggatgtaata atatttgtct 60720
ctaactgtc ttgccactgt aacaaccaca caaactaata ttaagtgatg tctgaaatga 60780
atgaatgaat aggaaaatac tagtacttgt ttaatattcg atagccatat aattaaacc 60840
atggcttata ggttatttaa atcaaagtga gccttgtgat tatgcaacta aaatataaac 60900
acatatagat gaatcttttag cttgattagg aggaataata acagagctag tgtgactagt 60960
tatgatatag cttgttgtcg gttgcctata tttagtaaat ggttcaatgt taataactg 61020
atgcacacac ataccctttt tgataaccta ctagttgcat atattaaact tggtataaaa 61080
tgaagaacca atatattagc taaatactgg tgctagtatt aaatcttgac cacacataat 61140
tttagttcaa accacacctg aggattgttc gttataaagt tataaagtta taaagttata 61200
caaaagataa tatgtaacta taatagtatt aaaccacaaa tctaaaatac agggcgcata 61260
attgtcaacc ttttatgcaa acggataata tccatatata tacatcatgt ggataattcg 61320
aataatagct ccattggtaa aataataatg taggcgaatc atggtgatga gatggtttat 61380
cctaaacctc cccatcgaca tagccatgct ataggacct gaccatttta cttcataac 61440
agatctcttc cataagccaa tagctagact aaaccacaga ttagcaaatg tgtacatcat 61500
atattgtgct agttagtacc aatagaacca tcaggacaat ataaatacta aggaatctta 61560
gctcttagct tgattagaat ccaatagcaa acacgagtag tatgagcagc cttaggttcg 61620
acctcaataa ttatattttg cttgtgcata attgcttctt gttgaatatt ggtttttctc 61680
gcatattata gaaattgtat atcggttagt cgtgaggcaa cgtatgcagc tttcaggagg 61740
tgaaggttga tcaagattgt atcaagaata atgactattc taagcaggca agtcatcact 61800

attccttgaa catgttgatc ctaattgcga aattatittg tttaaaata aaattgcatg 61860
caatgatgaa catcctactt gtgattatgc catgccttga ttattgttta cccttaaaat 61920
ccttgtaacc atgattacgt atgagtcctt agtcaattat gacaattgct tagagatgct 61980
attctagaat catgcatact catatttatc aaatgctata tgcttgggca attacctttg 62040
ggaaggtaat tgagatgcgg catgtggaga catgaacgcc acattgccat gatattaatg 62100
acatgatttg tgaaaggaga aataaaatta aacaactgtt ttcgactggg gcggacggag 62160
gatttgggtg gtatctggaa aaggctagta ccgtccccgg tcaattaagg accgagccat 62220
gaagttaagc atgaaacgac cccgtacaa ccgcacttct cgtatgggta tagacctagc 62280
ggagtagata gctgagcggg ggcagtatcc atgcatagtg gtttcttgat gtgtgaggca 62340
ggggctctac ggtggggcag ccattggtag gaccgcaagg cgggtatcta cagtgggtgc 62400
gccatcggta ggactgccat gtgagaatct aaaacataat tataacttaa tgcattgtgtg 62460
agtcttcctt tcccgggtgc gccagaactc ctctcactgc tagaaaccgt gtacgcctag 62520
agtgcattgag gatgaaaagt tcatggagcg ggtactgcca atgcgaggtt atcgaaaagc 62580
tctgccgtga cgcattctcat gtgttgggac gaggtctatg tgttgggcag tcgcggagtg 62640
cgggtaaatg gtacatccac tgcagtgtga gtaaaccaaa tctattcgaa tagccgtgct 62700
cgcggttatt gagcaccggg acatgtatta cacttggcta gactctaaat tcttaacttg 62760
tggggaatgg gatattgcat gatgaatttt atgctgatgg agccacatcc cgagaggagg 62820
gaaggtggac atcctcagaa aaccatgacg attcaatggc gggaagctat ccttgggatc 62880
acaatggatg gtggacagaa ccgtcgttgt ttaaagtga cactgggtact aaaatttgat 62940
cgatctatgc taggttttag gcttgtgaaa agaattgtaa aattagcttt atgcaaaagg 63000
acctgaagcc attccttgaa ataccctcta tcatatgcat tgttattatg gtggcttgct 63060
gagtacggtt ggtactcacc cttgctatct atatatcttt taggagagtg ttgaagagaa 63120
gcccttgctg gtacgcttgc gtatcccaca agatgatcgg agtgcggtct tgttctaggt 63180
ctcgtttccc cagtcgactg cctgtggcat gttaccggg cccttatatt attttgtctt 63240
tcgctgttgt tctctgatag ttgttggcct acctggccct aatgtaagta tttaactctt 63300
ttagcctaaa ttcattcgtg atatgttgtg atccaactat gtatgtgtgt accaactact 63360
gatccaggga ttggtacgga taaacacaga agatttccga ttccaaaat cgggggtcta 63420
cacctgaccc cctcaggggg ggggggtcgg gcccgagggt gatgtggccg cccccctctt 63480
tgtctccccg aggggtcgga ccgctcccg ttctgccccg agggctgagg cgccccgacc 63540

ccttgtgggt ttgtcgccgc gtgtatgggt taggtgagca caacggggct cacctaaccg 63600
tattttattgt ggtttggacg agcgcgtcac gccgcatgta gcgcagtgca gcgcgctcgt 63660
ttatccggtc tgtgaccagt cacagaccgg tcagatcgtg ggtaggtgg caacaggcgg 63720
tctgacacac gcctcgcccc atcccgtcag gataagagcc tccaggcact tgtccctagc 63780
ccggagccag catgctaact cctggagatg acacgttggg cccggtcaga tatatgccag 63840
gcttcatccc aaccattaca agcaagatat tgtatgaaga agggcgaaca tgcagattgc 63900
tggactgaca cgtgggtggac aagaatgacc gatttgtgac cggctctgaca ctgggtcatgt 63960
cgtcggcaga caaccatgtt cccacgttgc acctgctttc ggcgagtggt aggtaggtat 64020
gggcatccc atcagaaggt cgttcggaca gcagccattg caagtctccg cccatttatg 64080
aagagatgac aggggtgatcc cctggagaga aaaaaaggag gaccttgccc acttaggagg 64140
tgaggacgac tggaagggga gaggatctgg agagtagatc ccacgagagg aaaaaaggga 64200
gaagagggtt tctagagtaa gagctctctg actctccagc tctttgtagc ttcttcgtac 64260
acagatccac cagaaaatag gagtaggta ttacgttct cagcggcccg aacctgtata 64320
catcgcccggt gtcttgtgct tttttcattc tcgcgaactt tccacagact aggagcttag 64380
aatctcgccc agggcccccg gccgaaccgg caaagggggg cctgcgcggt ctcccggta 64440
ggagccccac gtcctgcaa ctttggctta taattaaaaa tactctaagg atattttttt 64500
atattttatt ttcttatgtc tatatgaaat tttaaataag atagatgggt aaacatatat 64560
tggaataaca tatatccaaa agtccactat cacaagcgta gcatagatac gattacaata 64620
cgtttccgcg aagactgttt atacctactc tattccctgt tccttgtgcg gttgtgcat 64680
ttggggctgt tttttcatct cggattaact cgcgtggaaa ccgcgagacg aatgttttga 64740
gcctaattaa tccgtcatta gcatatatgg gttattatag cacttatggc taatcatggc 64800
ctaattagac ttaaaagatt cgtctcatga ttacatgca aactatgcaa ttagtttttc 64860
tttttatcta tatttaatgc ttcatatatg tgtccaaaga ttgatgcga tgttctggga 64920
aaatcttttt ttaactaaac atgccaagg tgtttctcca attaagttga cccaaaatca 64980
ttcggcgtca ctttgtctt tcactttcct tccactacaa ggtgatgaca ctgacaaaag 65040
gtccaaaagc tacaggatct gatttttgtt catccatctg tgatgtgtcg gcaagccatc 65100
catggagttc atccactcaa ctctctctc tcagagagag agagagagag agagacagac 65160
agacacatgc atgatagatt gtgctagtag ggtagtaaca ttttattgcc tccttttcta 65220
aaattctagg ttgtttggaa aacaaaaatt ctagattgtt caataaatta ataatttag 65280

gtatttattt taagtcactt taggtgttaa tttttgaatt ttaaactgct taaactctct 65340
ttcgacgcat ctgagagcag gtacaatagc agactataag ccagctataa atatatttta 65400
agtagataaa agaggaaaaa taagagtagc gggctataga tttgtagaca gctgcagcgc 65460
gagctccaag atacatatgt gtatgacatg tgagaccaa cattaattat gtagtatatg 65520
tttatatgta tctattgtat gaattggcta ttaaattgac tatgggtgtg ttcggagggtg 65580
ggtgttggga accatctccc aagcacggaa aacggagcgg tccattatgg cgtgattaat 65640
taagtattag ctatttttta aaaaaataa tcaatatgat ttttttaaac aacttttgta 65700
tagaaacttt ttgcaaaaac tcaccgttta gtagtttgaa aagcgtgcgc gcggaatatg 65760
agggagaggg gttgggaacc tcctcatccg aacgcagcct atacatgatt tggagccaat 65820
agttggctat aatatataac ttgctctgag tggctcttga atcatcgaag tgatagaaat 65880
catatgcaga aatgtttata tttgtgatgt aaaatttgaa tctaaaatta tttatatttt 65940
gaaatggagg aagtactacc taaaacaagt atgagaaaga gacatgaaaa acacaaaatc 66000
tagacttaaa aataattgga attactagca ggaggtcgaa gtcaatcaag acggcgaaga 66060
aaagcacagg ggacagcaga cacgttaaca cgtaagtaaa caaacaagtg gttaattaat 66120
tagggggccc tcaagtctcc cctaaagcca ctaaactga caggtttgtg taccatggaa 66180
aaaagggtga agcaaaactt tattctctct ctcattagat taccagttgg aaagcaatcc 66240
tgggacctct agctaacttc attattgtag aacaacgttt tcttagagag agagagagag 66300
agaaataagt caataaaaat tactactaat ccacttgaac cagttctgtc ggtgtcggat 66360
gatttaccac atttgacgaa acggactatt tattcgacgt ttcgaaaaac acactttttt 66420
agaaaaaaaa aactttcttc tattagccac tcgttttagt tatataccta tccgagtatc 66480
tgttaagttt atttatcaa atatttaatt tatctctata attaaatata caatccgtaa 66540
aaacaatcac gcagtaattc gtttcaaact gagcctcagc tagaaaatca aaatggaaat 66600
gaataacaat agcaacagta gagttagttt ttcggcttat catccgcaac ccaaatgcga 66660
attttaaact tagccttaga gtaattttt aaggcttggt taccatactt cattttccca 66720
gcattagttt cttttgtcac taaaaattgt ttttttaagt tgtttcgttc attttctcac 66780
ggtttatcag cagtagagcg aagccattct tggagcctgt ttggcacagc tctagctcca 66840
gctctagctc cactctttct ggagctggag ctcagcccaa cagttttagg tgcacaaaaa 66900
ttaggagtgt agttgggtgg aactctctca caaaaaattg tggagctgga tttagacagc 66960
tccacaactt cactccaaac ccaactcctg aagttaaatt gataagttga agctctatct 67020

atcaagccct ttttcttgat catgcttcta cctactccat ttttgtttct tggccctcac 67080
aggaattgga aaggaaaggc gtatatgcat caatgcatgc atgcgcacat caacctcgtc 67140
catcaacat cataatcatc atcatctcgc cagctgacga aatgacctg catccatcca 67200
tcacggacaa tccaagcgaa caccgctacc aacatcacag ccaacctgtt tatcactagc 67260
tcttgatacc actcctacat aaacactacg cgcaggttaa ttaattaagc gtgattactg 67320
aagtaacatc taatcacgtc ctgggttagcc tttaataaga caacagttag agcaggtaca 67380
atagcagcag gatataagcc agctataaaa aaagagagaa aagagcaacg ggctacagat 67440
ctatagccag ctgtagcatg gacttcaaga cacaacgtgt gtataacagg tgggaccaga 67500
taataatagt gtagttagt aagtaactat tatatatatt gactatagat gatttgagc 67560
tattagtgtg ctatagtatt aaacttgctc atagagcagg tacaatagta ggatattagc 67620
cagctataaa catattataa tgagataaac attgatagag aagagcagcg ggctacagat 67680
ctgtagccag ctacaacacg gactccaaga cacaacgagt gtatgacaga tgggaccaga 67740
tattagtagt atagtaagca actattatat aaattaacta ttacattggc tatagatgat 67800
ttggagttag tagtgggcta tactattaaa ctttttctct tagcaaaaat caagcgcta 67860
atcacattag aggagtagct ttgagacaaa ccaattagcg gcgaatcaag cgatctgcgt 67920
ggctgtacag tgatgggccc ggccggggccc acagcccgac agtgacaggg ggctgtacgc 67980
atgtcagcct cagccctgga cgggagctag ccgttgtgtc cccgggggag gggagggggg 68040
cattcccatc atttcgcccc tcctccgggc ccacatctca gtgggggtaa aggtgtaaat 68100
tactgcgacc gcgagtcag cgagcctaga tttggacctt gtgtccgttt gactgaaccg 68160
gagctactcc ccaatacggg gggattgcgt tgtgtgcatg ccatgtgggc ccgagcgccc 68220
tttgttcgtg gctttgggtt ggaaaggtga ccgtgtgagc tgtgcggtgt tgtactacgt 68280
attagtataa atcatttttg ggtactactc cctccgtcca aagcttattt ataatttggt 68340
gtactccaac cgtccgtctt atttaaaaaa aatataaaaa aaattaaaaa aataagtcac 68400
acataaaata ttaatcatgt tttatcatct aacaataaaa aataactaatt ataaaaaat 68460
ttcatataaa acggacagtc aaacattgtc acgaaaatct aatgtttgcc tttttttta 68520
agaccaaggg agtatctacg aacaaagata atacatgta taatcatgaa gcccatgatg 68580
tgattagccc ggccgtttga ctaacctcac gagctacgtg gctgacaagt ttaacttggt 68640
aactccatca tttcggatac ttagagcatg tacaatagca gactattagc cagctataaa 68700
catattttta tgggataaaa gatgagagag aagagcagcg ggctacagat ttatagccag 68760

ctgcagcacg gactccaaga cgcaatatgt gtatgacagg taagaccata tgtaaatagt 68820
atagtaagca actatTTTTat aaactggcta ttagatcggc tatagataaa ttggagctag 68880
tagtggacta tactattcaa cttgctctta tatgatataa atattgatat aactatatga 68940
TTTTgttaat gacatgtttg tttatggatg gactatgtgg ggtcggtcgc ctccgtagct 69000
gacccaaaata caaacTTaaa acccctatct ataaaaatct aactTTTgtt tataaatata 69060
gatataaaag ttcataatta gagcctcatc ttttaaacga aaagagtact atgaaaacaa 69120
ctcgtaatac aaagactaat tacgacgaaa agaaaatagt actgacaaga ggaaagcagt 69180
gaacttgcac actccctccg taaaaaaaaac caacctagac acggatataa cactatatat 69240
ctagattcgt tcgttgtaat gaagtgtcac ctccgtatct aggttggttt ttcgtacga 69300
aagaagtatg agtaaatcta aagctatgta tacccttcgt caaaaaaaaaa aagtaaacct 69360
tgtactgggtg cgtgtcacat cctaataataa tatgtTTTT tatggagggt gtacagtga 69420
aaaaaattga tgtgtTTTaa ggatgaaaaa tattggtaat gttggctatg taactctaga 69480
aaaaaaaaatg cagtaataat aaaatgctaa tttgctggag tactagatta tagacaatcc 69540
agtccaggac acgacaccct ccctactctc tccacttcca ctctcaccgg ccaccgcgcg 69600
ctctctctct ctctctcccc cttctcccg aagattcttc ccccaaacc caccgatcc 69660
accgccgccg cccgctcgcc ggagtcccat cgtgccacc gccgccggag ccgcgccccg 69720
acgcccgccg ggccgtcttg ctgtgtgtgt gaggagggtg agttgctcgc gctcgttccc 69780
gcggccacct ccgcctgtg ctgcttctgc ttccgctggc attgcgggga ggtcgtgtgc 69840
cgggggacgt gggggctcgt gttggagcgc ggctgccgt gaggtggggg gtgcggcgcg 69900
gcgcggctcg cgctcgtgcg ccggtggcgc gggcgcgggg ggaagcgta gggggagggg 69960
gagtgtggcg gcggcggcgc gcggggtagg gacgggcgcc gccaccacca ccggctcgtt 70020
cgctggcagg cgctacgct ccagatccgt acgccgtat gcttcgtctc gccgaactc 70080
tctccatttg attagtatcc cctcgccgaa acgaggcctg tgaggcgccc gctttctggc 70140
tggttccct gtactcgtg cttgctcctg cctgttggt taaccggtt ccatcgaatt 70200
tgggtaagcg aaacatcgcc tcatatgggc atttgggtt ctggcagcct taggctcgcc 70260
atccgtcgcc gagcttccaa gtgaccggcg cttgttggt tatttgcttg cttgttctg 70320
tttggtggct gcgctaaatc ttttgtctg cattgaatt atgccacca tatacagcaa 70380
attactgagc tgaataaatt cggctaatta ggtccagcaa tatgacatct cgtggattga 70440
atgctaagct gacattgtat cactgatgct ggcttatata taggttggtt agaagtgaag 70500

atgtcgacag gtgaaaccct gcgtgcagag ctatcatcca ggacgccgcc tttcggtttg 70560
aggctatgga ttgtgattgg aatcagtatt tgggtggtga tcttctttat actaggtttc 70620
atgtgcctct ggtccatata ccgaaggaag ccgaagaagt cctttgataa gattccagta 70680
tctcaaatcc cggatgtttc caaggagatt gcagtagatg aagttcgtga gcatgctgtt 70740
gtcgaaaact tccgtgtgca agaaagccac gcgatatcgg tgcaggagaa acattacgag 70800
aaagattcag ggaaaatgct ggcacacttg gttaggagta aatcgagtga tgccgataat 70860
ttgagccaat gcagctcggg gtaccaatgt gatagggtcg gtagctcgta ttctggtgat 70920
gaaggcagct cgggcaatgc taggaggcac ttttctcaat atgcaactgt ctacagatcc 70980
cctctggttg gtctcccaga attctctcat ctgggctggg gtcattgggt tactctgaga 71040
gatttggagc atgcaacaaa tcggttttcc aaggagaatg tcattggaga gggtagatat 71100
gggtagttt accgtggctg actcataaat ggaactgacg tcgcaataaa gaagcttctt 71160
aataatatgt aagagatcct gaaatctatt ctgcgtttta cagaacttgt gactccttct 71220
gatgccatca tattaatfff cttttgatat ggtgctgcag gggccaggca gaaaaggagt 71280
tcagggttga agttgaggct attggccacg tcaggcataa gaatcttgct cgccttctag 71340
gatattgtgt tgagggaatc cacaggtaaa gctattttat aatcaccttt gctgatggat 71400
ggtagcttt tgtttctact ggcacattat ttacttgcat agggatgtag gattgctctt 71460
ggtctatgtc cacctactca ccagattatc tcaagggata gggtattcct gactgcactc 71520
cttatgctat cgattttttc ctttccaaat ctgatgggtg gattcagcat gccagtgac 71580
agattatgct cagtcacacg aaaccttctt tggaccacca ttcttttacc atgaaaatgt 71640
ggccatagct ccgaaagcta ggattcacta gaagcgcaca actgcttatt ggtttgtag 71700
ttggctataa caaggtctta ctgaaatgta cttccatagt tcattacttt gtgaatgcct 71760
gttcttggtc ttcacgtttc ttctcatgca tgttcaattc taaatttgta ttcatgatat 71820
gtccaagcta ctgtattctc caaagaaaat cagaagtcca ttcacctatg tattttccag 71880
ttttccgcca ttttggtatc tgctctagaa acaagttaat aatatagata tttatatggt 71940
ttggccagtg ctgcttaagt gaccatcgag atagaaattg ctttaagaaat atactaagat 72000
gttgagtgtc aggtgttttc ggataatctt gttaccaaca aataggtcct atgaatataa 72060
tggtgtctgc ttcacgtaat tcaaaatcca cactcagcca aaataatctg caatagggtg 72120
ttgaaaatat gattatgttt ctcccttggt ttcacatga ctacagaaat gaacaatgtt 72180
gctacatctt gtaataatft gtggttttca attgaacaaa acatccatca aatgatattt 72240

acagcaatat attttgcact tctgagcaca caataggttt gagtgtattc gagtcatggt 72300
cattgattta agctttttat ttactacat aaccattgat ttgagtgtat ctaaggagtt 72360
ctgtttccac aagtacttta tgtaaatggt gtctccttat gctttggcca tccaaactca 72420
ttactgttgt ttaatatatt tagtggttag tgggtgccaa atctttcttt gtgtacatca 72480
tactatgttt ttgtagtcta ttaaacttcc atcctatcat ctgacttggt atattccagg 72540
atgcttgat acgaatatgt gaataacggg aacttagaac agtggttca tgggtgccatg 72600
cgccaacatg gtgttcttac ctgggaagcc cgaatgaaag ttgttcttgg aattgctaaa 72660
gcgtaagaaa caaacatcg tccccgtcaa aaagaaaaga attgttcttc actttagctc 72720
ttttatatgt atatgttttag ttgcataacc cattttccat aactgaattg gtatacaggc 72780
ttgcttattt acatgaagca atagagccaa aagttgtaca cgggatatc aaatcaagca 72840
acatacta atcgatgaagaa ttcaatggca aactttctga ttttggcttg gctaagatgc 72900
tgggtgcagg gaagagccat atcacaactc gagttatggg aacttttggg tatgttgata 72960
tttttttggg gttagtatta atctttccta tgcttagctt ttactgttg aatgtgcagt 73020
acttcgctta ttcatacagt ataaaatttt acatgctgcg aactttgtcc ttcgtatatt 73080
ataacaggta gctttctcat tgctatcatt gattcatttc aggtatgtgg cccctgagta 73140
tgccaacaca ggtctgtaa acgagaagag tgatgtctac agttttggtg tgctattact 73200
ggaagcagtg actggtagag atccagttga ttatggccgg cctgctaag aggtgagcat 73260
atatactaca atctcatgcg tattatgtat gttacaaaag tccgtactat tggaaattat 73320
tttacggcaa aataacgtct atactaggag agacgaattt gcttcaggtg tatggctgtc 73380
tggcagttgt ctactgtcta gttacccttg tctactttt acagtctatt gttttatttt 73440
tcaggagctg actagctgta taccttgta tatatacaa cactgtaacg tggatgcctt 73500
gcaggtgcat ctagtggagt ggctcaaaat gatggttggc acaagaagag ctgaagaggt 73560
agttgaccct gacatggagg tcaaaccgac cattcgggct ctttaagcgtg ctctcctagt 73620
ggcactgagg tgcgtcgacc cagactctga gaaaagacct actatgggtc atgttggttcg 73680
gatgctcgag gcagaagatg tcccatcccg tgaggtggta acgctttctc ctttctgca 73740
ataacattca tcatattata tcattgcaat aaatctgaag cttttgctgt aatcctactg 73800
aaggaccgga ggagccggag gggcaacact gccaatgcag ataccgagtc caagacaagc 73860
tcaagcgaat tcgagataag tggcgataga agggactcag ggccatcagc aaggtttcaa 73920
ctctaagaag acggtgatca tagtcaagaa caatggcttc aaaactctat gcagtaacat 73980

ggtaggtggc agagaaaaag gggtagttct ggagggcatt gcattttgta ttgtaggtct 74040
gcatggcggt agagactgga gagagcacag tgtctgatga tggatacccg gagacctgta 74100
attcccatc agtattctgt ttgttagtca agcagcttgt acagatcggt gtctgttcca 74160
ttttttcatt cttctgggtt tttgttttag gaggtctttg gattaccagt acgaaccgct 74220
gtctcttttc tagaatcacc aacatggaac ctatcaatat ttactactag tactacgact 74280
tgctttcttc ttgctgagat ctatcatgta ctgtacataa ctgacgtgtt cagctgcact 74340
tggacaagta gatgctcggt ctgtatgtcg aatttacttg atgaggtcga gcattaagta 74400
ccatggctgc agccggcttc tgtttagttg tgctgacatg cggcgggcgac ctacgctgt 74460
gtggcccatt cttgatcttg ggccgaaact gtagcaacgg gcgtacggcc catctatatc 74520
gggattgttc ggcccggtgt agatggggcg gatcgggatt gcgacttacg tgcgacccat 74580
ttcggttggg ccggtgggtc gctacttcat ctagcagtgg tcggcggcag ggttcacaat 74640
tccaatagaa tccaaacatt attggattga gttaaaaaca caaaccaatc ggctttttgt 74700
caggttcaga aaattttaaa ctgaatttta attttttgac aaaaatctat ttagatttcg 74760
tctgtttttt taggtttgtc aacggattca gcgaaatccg atgatatcgc tcgtgagtgg 74820
atttttgatc cggtatcgag attgtgaacc cttgtcgcgc attgcctgac aaagacaacc 74880
agtgaagcgc cgtgcgcgcc gcgtgcgcgc cgcgtgacgc gaagatgcgc aggaaggaac 74940
aagctggcaa gcggcgccgc catgacggcg gcggcgacga cgaccgcgc gcgtgcgtgc 75000
gtcaacgcac gcgaccggcc gagatccgtc agtggccgcg gctatatata atacatcgtc 75060
gcctcacacc cccacacac cgagtcacgc ctgcgggag ttagagtctg tagcggcgaa 75120
ggatatagcc atatattata gatggcgatt ggtgttggtg gctgctgcgc cgtgctgctc 75180
gcggcggcgc tgctcttctc ctctccggcc accacatgta agcacgcca tcttcttctt 75240
cttcttcttt ttttcttctt tttttttttt tttttggaaa tgagccgcag ctgacaaaaa 75300
gatcactcac acatggatac actgtcgtga cactaaccaa tgcctaagcc attttgtttt 75360
cttgttttgg attttcttt ttatgtgtat cacttttgct tgttgctctt gcagatgctt 75420
atgattccct ggatccaaac ggcaacatca cgataaaatg ggatgtgatg caatggactc 75480
ctgatggcta tgctgtaagt agcggtgga gtacaccaac atctctacct ttattttcgt 75540
ctcaacctgt acatttacac tatcttggtc tactacctct aataaaaaaa tatatttgat 75600
gttttaaaat ctattaagtt ctagagatta ggaaagctac acatggtttt atgttttgat 75660
actattaagt agtatatttt ataagttata ttgaaggctg gggtttcaaa agtttgacta 75720

cactagatct tattcaaagc gtctaatact tactgaacgg aggaagtatg aacttataga 75780
 cttgaagtta aacagcatag ccacatctct tcatgtatac ttcattccgtt tcatattata 75840
 agattttcta gcattatcca tattcatata tgtgcgtcta gattcattaa tatctatatg 75900
 aattgggcaa tgctataaaa tcttataacc tgagaaacgg agggagtatg tcgcaaacia 75960
 caacaacaat aacaacgagc aaaatctgta tcgaatccgg tttccctctt gtaactgtat 76020
 caaagatctg tcctctgaaa cgtcccctgt tcatcaggcc gttgtcacac tgtccaacta 76080
 ccagcaattc cggcacatcc agccaccggg gtggcagctg ggggtggacat ggcagcagaa 76140
 ggaggtgatc tgggtccatgt acggcgcgca ggccatcgag cagggcgact gctccatgtc 76200
 caaggagggc agcaatgtcc cccacagctg caagaagcat cccaccgtcg tcgacctcct 76260
 cccgggcacc ccaatcagac tgcagatcgc caactgctgc aaggctggat cactgagcgc 76320
 attcagccag gacccggcaa attctgccgc gtcgtttcag atc 76363

<210> 28

<211> 53905

<212> DNA

<213> Orza sativa Asominori

<400> 28

gatcagttag tgagagttag gtgctattga ttttcgtcta ggattttgct gtgctcttct 60
 tcttcttctc ctctctacca agaaagatcg atggaggaga attttagga cgcgtttctc 120
 acgaattact tagctgttaa tgatcagctt gatgtgtacg atatgatggg gcagagttaa 180
 agttgtgttg ttactgggtg gatcatggga tgggaatatg ggattgtgtg aagatgtaac 240
 tcaagtgttt tcttttttgg gattactttt ggtaataaga gcttgggtga tcgaaaacta 300
 cagatggttt ttcttttaag ttgtatgac tctgtagagt ttttgagtaa tttgtagttt 360
 tgtaccctat caaagatcat ctctagctgc ctctgagctc tccaactcta tatgtccatc 420
 tctagtatat atgtcccata tttctgactg aaaattttca agtcggttgg ttccctccgc 480
 ctggatatcc ttccagctaa ttagattttt tttaaataat aaatttgcta aaagcttggt 540
 caaattcagc taagatctat tcaaacttca atttctctat cgaaattccc ggaaatttca 600
 attcaatcat tcccataac atgccgattt ccgtaatat gaaccatgac atgtaacaaa 660
 cgaaggaatc aagggcataat ttagtttcat ctacatcga atatacggac acacatttga 720

agtattaaat gcactctaataacaaaacaa attacagatt ccgccagaaa actacgagac 780
gaatctatta agcctaatta atacatcatt agcaaagtgt tactatagca ccacattgtc 840
aactcatgac gcaattaggc ttaaaagatt cgtctcgcag tttcctgacg aaccgtgtaa 900
ttattatfff ttctacgttt aatactttat gtatgtgccc aaatattcaa tgtgacaacg 960
tgaaaatfff tatttggaac taaataggcc ctaatatctt ttcaagatat tagaatagtt 1020
atccctctcc acctccctgc acaaacagtg aacttctttc tccttgggca caggagtagt 1080
agcagctccc ggaaacagaa agcaatcaag caaagtcctg aacctgaagc atcctgaaac 1140
cagcagacgg cagaaaccag tgggcgcagg cgatagcagt ttttcgtggt ccggcgtaaca 1200
gccaaaatac tggccatcgg gtgcctacat agaagtagtc cactggacgc agctaccacc 1260
gtgtgtgcta cactgaccgc cgctgctcgt cgaccagttg tacggggctg acttattctg 1320
aatttctaata ggtttatttg ggggtttaga aactgaggg gtgctttaga tccaaagatg 1380
tgaagtttgg gcgtgtcaca tcgggtatta tatatagttg cgcacagggt gtttgggcac 1440
taataaaaaat actaattatt gatcctatac gataagctat ataatactcg atgtgacacg 1500
ccaaaacttt acatccctga atctaaacac ctttttaaat agagtatttg gtgtgaaata 1560
taattttgat ttgggaagaa ggtgagtgag atttggaaaa aaaaagcatt tcaattaaaa 1620
aatttgccag cagtaaataa agaaactact cggttttgta attaaagtga ggttttggca 1680
cttctttgcc ctaaactggc ctccatttta taaagtgaga accgtgcagc aaaagcctga 1740
aaaggcaaaa agaaagaaat tgtagagggt tttcaggagg atacaactag gtgggtctct 1800
aactctctat gcagctgtgg tctgtggagc aaaacgatga aatggaagac gggacgttga 1860
cgagggtgaa gaaaacgagc gtttgaccag cgtcaaccat ggcgtaaca gtagcaccac 1920
taacctgacc gagaggttga agaagatgca atcaacgggg tactatagtt ccacgaatt 1980
tcccagcaac aacgggttgg ttctcactac tcacgaattc cctgtggctc acaactact 2040
agtacatcct tttgtccatt atgataaaag ttctatctta atttttattt acacgttttt 2100
caaactgttt ttttaatttc tatataaaaa atacttaaaa tatcaaataa aatctatttt 2160
tggagtttta aaaaactcaa ttaatcatat atattattga cttattttat tttacgtgga 2220
ctaaaatata ttcatcttca tttaggttat gttcttttct catcaagata catgatacat 2280
tagcatgttt ttcaaactgt tttttaattt tgtatataaa cttactctaa aatatcaaat 2340
aaaatttact tttaggttt ataaaagtaa aactcaatta atcattacta acttgtttca 2400
ttttacgtgg actaaaatat cttcatcttc atctaagggtg gtgtttggat ccaaggacta 2460

aattttaatc cctatcacat cggatatitg acactaatta gaagtattaa acatagatta 2520
atgatgaaac ccattccata accctggact aattcgcgag acgaatatat tgagcataat 2580
taatccatga ttagcctatg tgatgctgta gtaaacaatgt actaattacg gattaattaa 2640
gcttaaaaaa tttatcttac gaattagctc tcattttatac aattaatttt attgttagtt 2700
tacgtttaat actttttaatt agtatacatc cgacgtaaca ctgacgata caaacaccaa 2760
ctaaatcgaa aatcaccgaa tggctcgtca tcctcccaca tgagatgcca agatggaaca 2820
ccaacaatcc aacggctagg aagcgcccca tcccaccac cgcctaaccg ccttcctatg 2880
caagtgggtc ccacccttc ctctctttt ttttctttt taaaaatccc ctccctttc 2940
ttggctagct agctagcttg gcccaacgcc acgagccgag ccgagcacat ccggagccaa 3000
gccgagctca ggcctcagc tccccctct cctcgtecca ttcccggtt cctcctccga 3060
ttcccccaa atccgcagc ctctccctc gcctccatt tttccgatt cccaattccc 3120
aaatccgat cagccgcagc cgcagcagca aaaaatttcg aaatccaat ccaaaccat 3180
ccccccacg acgacgtcac ccacatcccc acccccgcga gacgagacga gacgactccc 3240
aaatctctct ctctctctc ctatgcgcgc gcccgccgcc gccgcagcag cagcagctag 3300
gaggcggagc agcagcagca gcagcagctg agatgatcgt gcgcacctac ggccgcagat 3360
cccgctcctt ctccgacggg ggaggagggg agcgcgccgg cggcggtggg ttctcgtcgt 3420
cgcaagacgc gttcgaattc gacggggagg aggaggacga cctcgtcctg ctggggtcgt 3480
cgtcgcagtc gtcgcacccg cccgcgccgt cgcaggagtc gtcgtcgatg tgggacttcg 3540
acgaggaccc gccgccgccg ccccgggcgc ggccgggggag ggggtgggggt ggggactacg 3600
cggagcccg caccggcggc gcggcgccgc cggcgccac ctcgctcatg gaggcggagg 3660
agtacggcga gatgatggag agcgtggacg aggcgaactt cgcgctcgac gggctgcgcg 3720
ccaccgcgcc gaggcgggtg cgcggggcca gcttcctcgc gctgctcggg atctgcgcct 3780
ccgcgccgcg ccgccgcgtc ctccgggccc aggggtcgtt acaccaaaga accctcctt 3840
ttttttctt actgtctgc gctgtaagta aagaataaca attcgcgtt ttgctcttg 3900
ttcgcgggca atcttggtga ggaatcttgt tagggttatg aaattgggca gccagttctt 3960
gtttctcttg cgtaatcttg gcggaacag tgggattttg tacgattatg gctccgtaat 4020
cggcatttct gtgggaaatg aaccacctt agggcatttg acctcgaac agcatgcttg 4080
gtgttgcaat ccgtagctat tgccttcac ttaggcacaa gaacttggtc tgaattatga 4140
tttaccact tgtgtttgtt ttcttgttct gagttttctt gcttggttag ggtaggggt 4200

atcaccgtgg tgggtgcagaa ttagatgttc gctacttgtc ttaacctctg ccttgcccaa 4260
tttgggtaccg agtgttacag ctgggttttag gaagtgtgat ctttgagcat ttctagcatg 4320
ttgggtctctt ttttttgcta atctcacatg gttgtagagg aaggaagcat agtgactgat 4380
gatgaatgcc tagatactag aaatacatct ttattaactg aattaggatt gcttgggtat 4440
ctatgtagat atgactgtag aatgttactg ctggaaatgc tatccaatat ccattgatct 4500
ctagcctaata atctctctcg aggccaagag atcagtcaat tttgaacttt caggagagtt 4560
tctatttggt acttaatctc ttttatttgt tacttttggg gcctggctct cttttcatga 4620
ttgctaagta gacaggtaaa gttctaccta aaattattct taaaagttca aaatcgcttt 4680
agattaagga gtgccagcca gagccttagg cagagtctta taaacaaaa gcacaatgct 4740
acaatgttca caaaactttt gtggaatttc cacttgagct gtataaacat cgcaatctac 4800
tgtgaataaa agaagcactt gatggaagt catgttagca aatgacatgt tttctgtgag 4860
gaggttgatt gcttgaactg ttatggactc ttgcaacttt ttattttact tegtacccat 4920
ttatgctaata gtgcacaaat aaaattgctg agagtaaaaa tgtacaactt gttacgcacc 4980
agcacacttc ctatttgtat ccattttcct gttgaatttc aaatgtattc aattgctgaa 5040
attgttccat tcaacaaaca catattccgt taatgaaatt attatacatt gcgttttgg 5100
ttcttactca caagtgtcct cttttcttat atcctataga ttggtgcaac aaattattga 5160
tgcaattttg gttttgaaca ttgatgatcc tccctgcact attggtgcag ctgctcttct 5220
attcgttttg gcaagtgatg tgagtacctc tcaatcccat ccttgtgctt ctgtgcatgc 5280
ttcattctat tttttacgca tatcgattgt ttctttttat ataacagccc ataaaaataa 5340
tcacatcatg gcaaagttat ttatttctcc agtacagtta tataagtatt caccactttt 5400
ccatgaatat cttggcatgt gattacaaag aagattattt aagaaagtcc atgcttttat 5460
ttcatcattt tgtttgaagt tgaactttaa tttatgggtg aaatttcagt taatattgct 5520
agcagctcgt attctttaat ggcataactt cacttgtgct tattctcaa tatctccctt 5580
cttgttggtc aggttcaaga aaatcatttg ttggattcag aatcttgtgt ccattttctt 5640
cttaaattat taaatcctcc agtgaatctt gttgattcca aagcaccatc gatagggtcc 5700
aaacttcttg gaatcagtaa agttcaaatg cttaatggat caaataagga ttctgactgc 5760
atttcagagg aaatcctttc aaaagttgaa gagattctct taagctgtca agagatcaag 5820
tcgctcgaca aagatgacaa gaaaacaaca aggccagaac tgtgtccaaa gtggcttgct 5880
ttgttgacaa tggaaaaggc atgcttgtct gctgtttcag tggagggtta gttttaatca 5940

aatttcttgg tcatgatttc cctttatgac cattataatt atttttatga gccaaataag 6000
cagttgccat aagttacata gcacctgttt acaatattca tgggtgggtt gcttagccct 6060
ttgcttcacc tgcctttgat tgatgacttc catccgtgtt gcacaactga attggagtaa 6120
ttgactgcac tagaagcacc tatggccatt gtcatactag gaaggttttc ccttatcaaa 6180
tatttgattg ttacagagac ttctgacact gtgtccagag tcggaggaaa ttttaaagag 6240
acattaaggg agttgggagg tcttgatagt atttttgacg ttatgatgga ttgccattca 6300
acattggagg tgagatctcg ctaacatcgc atattttaca cttcctttgt tcaactctaa 6360
aggatgggtgc aagttttgtt cttttttgcc atttttagctt taatgtgctt gaagccacat 6420
gaaagcaatg cttgtccaga tacatagcca aagggttgta tattttggga catggaaaat 6480
gcttgaggta gtaactatth tcatcaggac atggaaaatt ggctgcatca caaattatgt 6540
tgtttcatgt tgcaaaatag tttttaata cttttttatt ctgcatgtgg tgtagtgctc 6600
ttacagtgat tcctctgatg attatatccc ccacgataat aatacttgac atatctacac 6660
caagtggaca ttattcattt ggatgttact tttccagcta tacttgctgt tcttgcataa 6720
actttggagt aaattgcgta tccctttaag agataaactg cttgggtgctc ctatctgtgt 6780
actttttatg cccccaacta ataatgcaat catattacgc tgataaactg aataaataaa 6840
ttaacaatat acttctgggtg gaaaccttgt gtatcagaat ctcataaagg atacctcaac 6900
ttcagctttg gacctaaatg aaggaacatc tttgcaaagt gccgctctcc tcttgaaatg 6960
tttgaaaata ttggaatg ccacatttct aagcgatgat aacaaggtaa tgttccttat 7020
atattctgtt tcagtttagt acccattttc ttcttctgta ccatcttctc ccttcatttg 7080
ttctgtgcaa aatgtgcaa cagtgtgact ttgtatttct gcttaacatt tttctttttt 7140
tcctgaaaag cagtataaac tcttacactc attttgcttc ttgcagacc atttgcttaa 7200
tatgagtaga aaattgtacc cgaaacgctc ctgctttct tttgttggtg tcattatcag 7260
tattattgag ttattatcag gtatttttct taataatata atatgtccgc taacacaata 7320
aaatgtttta aacatccagt atgttaaagt tgcagctga cgcctatttt gttttgctgc 7380
agctctttca atactgcaga attcttctgt tgtttccagc tctacatata cgaaatcgtc 7440
taaagtctct caacagagt gctctggtta taacaaacac caaatttggt tgatcaactc 7500
gttggtttt ctgtgcaactg tttcaatata gtttggtcgc cattcaagtc tcaactacaga 7560
tggtgaactt gacctgacac ggtggcacca atatttataa aacgctacct gatattttta 7620
atatttcatg tttcctgacc cagattatct tggtgttcc tcatataagt ttaattagt 7680

tcgttcttga aactttgtta tgcagcagat gtcattgggg gaacttcatt taatgatgga 7740
aagcgcaaga actcgaagaa aaaaaacatt ttgtcgaacc agacacgcca tagttgctta 7800
tcttcaaaat cagaagtttc tcatattact atatcttctg gtagtgatgc tggctctgtca 7860
cagaaggcat tcaattgttc tccatctata tcaagcaatg gggcatcaag tggttcatta 7920
ggcgagagac atagcaatgg tggtgctttg aagttgaata taaaaaagga tcgtggcaat 7980
gcaaatccaa ttagaggctc aagtgggtgg atttcaataa gagcgcacag ttctgatggg 8040
aactccagag aatggcaaaa aagacgccgt ctatctgaaa atgtaatcac cgacagtggg 8100
ggcggatgat acccttttgc ttttgatgat gttgatcagg agccttcaaa ttgggaactg 8160
cttggccaa aaaagaaatc gcctcagaaa catcaagaca aatcaggaaa tggagtgtca 8220
gttgcaagtc atgaaccaga ccaacctgaa gatcttaatc agtcgggtac aacatctctt 8280
tttagtgcta aagatgaatc cagtcttttg gaagactgcc tcttggcatc agttaaggta 8340
attaaatatg tttccttctg atctttcttg tttcttcttc aagagaatat acattcttgg 8400
gtcacagtgt ctcggtttgt ctttgtagt ttgttgagt acatattttg aattcacaaa 8460
atttcctttt caatatggct cctcaatcta tagcatctgt cgtgtatgta ttctgtacaa 8520
aatagtattg taacatctcc tagaagaaat tggcaccatc catatcatac agtagcaatt 8580
tatgagacgt gatcctgatt ggaggtttag gacagagcct cgagctaaat tgctattgta 8640
ttgtatctac tatcttttag tacatgatat gtgctgggca ctctgtgtct gagtgtagt 8700
agtgttaag ttacatagt tcagctaaca tgcataatgta agacagttaa tgattaaatt 8760
taagtgtaga aagaaggtag tttcaaaaga tttttaagga caatataatt gtttcaccgg 8820
gactcatgct tgttctgact gtgagcctaa tgttaccttt acatgccctt acattgtcta 8880
tttttatcg ttttatgaga tcttccaaac aacttgatct gtcttaatgt tttttgcta 8940
gtcctttct tggatatctg gtaaattggt aggccgaagt atgaactttg cttattgtt 9000
tcaaagaaaa tgtaacaact cctggaaaag tctaattttg gttgcccttt attttgctga 9060
ccgtattggc acacatctaa ttctgctgtt ccttctggc aggttcttat gaacttagca 9120
aatgacaacc catctggttg tgaattgatt gcgtcatgtg gtggacttaa caccatggcc 9180
tccttgatca tgaagcattt cccctcattt tgtttgtcg tggacaacaa ctataacacg 9240
agagatgtca atcttgatca tgagttatca tcttctcaaa acagcaaggc acaccaggtc 9300
aaaattaagc aattgcgaga tcatgaactt gattttctgg ttgcatatt gggcttgctt 9360
gttaacctg tagagaagga tagccttaat aggttaagtcc ctcatatgct tccttcatt 9420

tgctcaattc atatcagtgt tactgttctg gcagttcctt ggggtcagga ctcaaaaaca 9480
tccaattaat gttcatgttc tcttaacgac tcagaaatac tttataacct ctccacaggg 9540
tacggctttc atctgcccgt gttcctgttg atctatctca gaatccacag agtgaagaga 9600
cacagagaga tgtcatagca ctctctgtt ctgtattctt agcaagtcaa ggtgctagt 9660
aagcttctgg aactatatca cggtaattc aaaattcttc aagttccttt tgtatgtaga 9720
ttatatcttt gtaaaactcg gcatttatta cctgctcttt gtttcaaaaa gcagtatttt 9780
attttgcctc ttagcatagg tcagcagaac agttgatctt attcagaaaa caatattttg 9840
catgtaacat actgttatct atgagatgaa aattaatgca tgtgtaataa tgtcaatgat 9900
aaatatttgc tatctgaatc cagtctacca actctagtta gaccgaaatt actgaggttc 9960
tatttcaaag aataatttag tgcaccattt gttcaactac tatgaagtaa aatggtattc 10020
ccttctattg acatcgggtt agaagtgaag ggccatctta atgcaatgtt ctcaatgcca 10080
caaaccaca aatttcatta acacatacag attattatta acatagctat aaattggatt 10140
tccagaagct tgagttgaat ttattttgtt acaattgaaa gcactgggaa cattagcatt 10200
tttttttagt tcttggttat tgcaatttat aatgttatac agaactgtgt acctcacaat 10260
gcattcatta tgacattcta tgaaccattt gattgactgt tgcttgtaaa caacaggatg 10320
atgaggagtc tttgatgcaa ggagcacggg aagctgaaat gatgatcgta gaggcctatg 10380
cagcccttct tcttgcggtt ctttcaactg aaaggtttgc aatctgtagt tgatggattg 10440
ttttattaat gtctaactac ttgcataatg tcagcactat ggcatttaac ttatactgtc 10500
tgttaactgc aacagcatga aggttcgttg agccatttcc agctgccttc caaataacag 10560
cttaaaaatc cttgtgcctg cgctagagaa atttgtggta tgtctccata attcttgaac 10620
tactgtttgt ataaaaaagt atggatgac tttgaattta ctccattttg gaaatcatta 10680
atttttcatg tctgagggtg gaggtgtcac cataattgta cttcccatcc aggaagcctg 10740
tttgcaaaat ttcacataaa taaggaaaat ttgaacttgt ttcaagtttg aatagtaaca 10800
ggatgtttta tttctcaact ggagaaaaca ttccggctgg gacttttaac ctttaaatg 10860
ctagtgtgct cccactgtaa gattgtctgc tgtcacattt gaaactttgt gtaatacctt 10920
tatcactacc cttgagatga gagacacaat ctggtaccga gtaagtatt tgataactcc 10980
cagttgaagt acagcaccaa atcaagccaa catgttggt acgtaattaa atgttctctt 11040
acaacagata gaggtaaaaa gggagtctt aagtatctaa cctcttacct tcttggtta 11100
gcactccagg cacaactctt tcttaacttg cgatttagga cttgactctg agaattattg 11160

gtgcccacac tggttgagtg catgcctatc taagctgcta gtttttgttc attttgatta 11220
actctgaagc tgcctgagct tattctgctt ccatcattta ttaatccatc atgtttctct 11280
ttcagtcgtt ccatctgcag ctcaatatga tcacagagga aacgcactca gctgtcacag 11340
aagttatcga gaaatgcaaa ctttcataga aagagtgaag aggggcctgt acagatcaac 11400
taacaacctc tttgcagcaa aaaagcatac acacaagtgt ttgtcttggc ctggggctct 11460
gcagatggac tgatactctg acctgcagtg ggcttgggag ctaacaatgg tttcattctt 11520
ttttttttta tgttttcccc tgttgTTTT gctcatgttt tgtgtaattt tttcttctca 11580
tctagcgatg ttatttttct tagcatgatg ggagtagccc tccttttttt tttctctaatt 11640
taagtgtaaa gtagcaacag catagggatg aatgttcagt gtagtgtgtg gtgtttcagt 11700
tattcagaga cgtccataca gttgtacct tgtgaccaca cgtcttaatc tgatgaagct 11760
tagaataaat cacatgttag caatgcaata tcatctgcgt cttctctcac tttggtggcc 11820
atcaaattct gtgtagaagt gtatggttg tgtgctgttg caaatgccgt attccgctct 11880
gttttgTgga agttaagaag tccctagtTg aaataccgat tttcatgat ctcggagatt 11940
gatgcaactc tgattgcagc atttcttttt attagaatgt acactccatg ctatcatgat 12000
gtttattgTt tagtactaca agatttggtt aaccattatt ttaatatcat aataatttta 12060
taaaatcttg gagtaacaag ttcataatac atgatagcat aactttttga ggctagtcta 12120
tgtatattgt ctcttttgTt tttaaactaa gcactcaata aattattgat ggctgtaatt 12180
ttctgaaggt ttcaccggtt tcggcccgTg ctttataaat agcttcggca caaaagacaa 12240
aacggTccct ccaacacata aatggttgag tttacgtttt cattatcttt ggtaaaatca 12300
agtccaccac gtagacactc ataacaaaag tttgaatata ctcagaaatt ttgacttgag 12360
tctatcttac ctttgatata ggacatccaa cctccctcc ctcctgaac tttatattat 12420
tcatattaca cctgaacttt atattattca tattacacc tgaagtggTt ttcatttaat 12480
tgcatacatg ctgaaatagt ttgacaacgt gagatgcaca aaatctacac gttcgtctta 12540
agttgcaatt cattttatcc cttttctttt tctctcttac ataggaatat caatagtact 12600
aattcacatt acaatatagt ataaattggt gatcgattat tggcaatata ctatattaaa 12660
tattcaaaac tagtcattta agctgccaaa taagtaaacc actatcgaaa accacaatat 12720
aaatggcatt acaaaactta gggggTtgaa tatccaattt taaagtTcat gatgctagag 12780
gaatttctat caaaagtTta tgggtacata tggacttttt cttttttaaa agaagctatt 12840
cttatcgtaa acgttaaata tttttgtac tttatttttt atgattgaaa aaaaaactta 12900

gttttcaaaa tgattggtct gtatacaagc atcaattaga cttataaat tcatctaaca 12960
gtttcctggc agaaactgta atttgTTTT gttattagac tacgtttatt atttcaaag 13020
tgtgtacgta tatccgatgt gacaaccaa cccaaaaatt ttcctaact ccatgaggcc 13080
ttacagatat atttgatggg tgtaaagttt ttttaagttct ttgggtgcaa agtttttaaa 13140
gtatacggac acacatttga agtattaaat atagacaaat aacaaaacat attacatatt 13200
ctgcctgtaa acaacgagac aaatttatta agcctaatta atctgtcatt agcaaagctt 13260
tactgcagca tcacattgtc aaatcatagc gtaattaggc tcaaaaatat tcgtctcgta 13320
atttcatgc aaactgtgta attggTTTT ttttctgca acatttaata ctccatgcat 13380
gtccaaatat ttgatgcgat ctttttgccc aaattttgtt ggaatctaaa caaggatcaa 13440
atttgctgaa tttttccaga cgtcacggct tgttcatcca tcgttcgcat cgcgattcgc 13500
caccgacgcc ttggtttcca acgaatttta tcatccgctt aaatacatcc aaagctctcc 13560
atcgccatcg gcggccaacg gcgaccgctc cgctctaccc aatccacca tccactcgcc 13620
gccgccccct gatccaaagc ctccgccgcg ccgccgtcga gaggaggagg aggaggagga 13680
ggaggaggag gaggcgtgag cccctatggg gacctcctc cggccgcgctc cgctcgccca 13740
cgccgccggc gccggcgacg ccacgccgtc gaccgcgcac ggtagccacg cgcctctcga 13800
gaggcccccc ccccgccgct cgctgatctc tcttctcatc ctgtttgggt ttgggtttgt 13860
gatttgggtg ttttttttt tccgcagcgg tgggtgtgag cgggtggccgc ggccgtggcg 13920
tggagtgcc gccgcatcgg gtgcgccgcc gccgggtcc gcaggttgcg gtggcgacgg 13980
cgagctggag gaggcggagg gagaccgtgg tgagatcgga tttcgccgct ggtggtgccg 14040
ctaccatggg ggattcgccg caggcgctct caggtttgca gcctcctcca ctctcttctc 14100
gcaaatgtg ttgctatgtt cctctcgctg ggctggcctc atagccatta atgtagtttg 14160
ctggaacatt acattcgga cgttggtggc aattgcttga caaatgtgg aattgtggag 14220
gggagaaaaa tcgtttgaac ctgcagtgac aaaattgcca tctataattt taaaactgaa 14280
ggtgtggaaa tcaaacataa tcattgccag cacatcattc ttgttaacca ccttgacata 14340
ttgttggtt ataacagtta gctccacacc aacttggaag gtgtcaatgg aatgtaagta 14400
taaattgagg ataactggca gttgttaaga ctttctacag aacttgtagc agctaaaact 14460
agctatttg catttatgtt tcatggaatt tgagcggcaa tggatatttc ttactaagac 14520
gtataatgca aaacaaaaaa aaaaaaaact atgtctatgc agtttacatg taatgtgcgg 14580
atgcaaataa aatcatgttc atggacaaac taatgggatt cataccaaat tccagaattg 14640

catttcttat gtggttactt ttgtttgttg atttggttac cagacatcga tgtggtttca 14700
agggtcagag gggtttgctt ctacgcggtg actgcagttg cagcaatctt tttgtttgtc 14760
gccatggttg tggttcatcc acttgtctc ctatttgacc gataccggag gagagctcag 14820
cactacattg caaagatttg ggcaactctg acaatttcca tgttctacaa gcttgacgtc 14880
gagggaatgg agaacctgcc accgaatagt agccctgctg tctatgttgc gaacctcag 14940
agtttcttgg atatctatac ctttctaact ctaggaaggt gtttcaagtt tataagcaag 15000
acaagtatat ttatgttccc aattattgga tgggcaatgt atctcttagg agtaattcct 15060
ttgcggcgta tggacagcag gagccagctg gtatggctgt agtctcatcc ctgctttctt 15120
aagtagacat atatacattt acagtatttg gtaaataaac aagattttat gaatcatata 15180
tgattttggg gaaaacacaa aactctctt gttggctgcc ttgaacatag ttctgttcac 15240
acagttatag caccttcttt aaaatgaaga actttgttgc atacacataa ggccaaacca 15300
cataatgaat tttgtttatt tctatctttg aatgttagca tcgtttttgt ttaatgcatg 15360
atcgccctcc tatatatattg tagtatgtca acattgtatt ccatgctgag cataacaaat 15420
ggtttgtaa aattcaggac tgtcttaaac ggtgtgtgga tttggtgaaa aaaggagcat 15480
ctgtattttt ctttccagag gggactagaa gcaaagatgg aaagctaggt gcatttaagg 15540
ttcagtaacc aaacttaggt tacattacat ctaatgagat ttttatattc agtatataat 15600
gttaaccttc tcatggtgta ctgacgtggt tataaatgtc cccagagagg tgcattcagt 15660
gtggctacaa agaccgggtgc tcctgtgata cctattactc ttctcgggac agggaaactg 15720
atgccttctg gaatggaagg catccttaat tcaggttcag taaagctcat tattcaccat 15780
ccaattgaag ggaatgatgc tgagaaatta tgttctgaag caaggaaggt gatagctgac 15840
actcttattc taaacggtta tggagtgcac taaagaaaga tgggtgtttt ttttattata 15900
tggaacctat tcaaaggcac agacaggctt tcaaggctaa gcttggttaca ggtactgata 15960
ctagttacta attactttcg taatcagtat aaataagctt gtgtagtgta atggcattgt 16020
acatttctgc acttggtaaa ttacagaag aggcaagtaa tattttagag gattgagttt 16080
attcaccag tcatatagtt gaagaggcaa gtaacctgta agagaggact gaacattaac 16140
acctcttggt cgattaaaaa tgaccaaaga gcatcaaaaca tgtattcgag gctgttactt 16200
tagatatggc ccattaattt gtttagttgt ctatgtacat cctagttggt gtaaatgcca 16260
gttaccattt ctatgatcta aaacaatcaa ctcttttagt atattttcaa aaacgaaaat 16320
tcagtacaca tgtatgaatc ttaatatctt tctctagctc gttacaaaag caacaaaggc 16380

accgtgtcag ctggttcaca ttagctagtt tgtacttagc attatccact agcaccttat 16440
tttcatgcat atcatgctaa ttgcttgcc cacgttgagt gggaattttt ttcattgtttt 16500
ataatttata tatgttttag acttctagtc cacaatttat gtacttcatg ttctgagcc 16560
tctagtatgg ctgatagcag actaggtgct gagtgtgtc cttttttgca gactgaagag 16620
agaagaaata caagactgtc cattgttagt cagatttgta aaaatagact ctgatgtagt 16680
ttacttttgc ccctatttta tttttaacaa tacaaatata taacagatcc taagaactta 16740
tcttaattta ggagaagttg ctcgtttcat taaattaaat tgtgaagtaa aaatgtgtgc 16800
tcgagtctgt caatgcaatc ctgtgttctt gtttgaagat atgggtgtagg gcaggccagg 16860
attgaacact gaatggtaag actgcttctg ccttcagacg ttattgctaa attttttagct 16920
acttgcagtt agtgcgtgca cgccgattaa gcagtagaac aaagtagttt tgcgtgtcac 16980
aaatgagtta tatttcattg gaaatcgaag cgaaaacgaa tcaaaagtta gaagaaaagg 17040
ggaaacttgg taattactcc ataaagagag tgcattttat tggtaatggtg gtatccggaa 17100
gctgtgagct ccgggctgta tgtattcttg caaatttgat atgagatgct cgattattgg 17160
cttaagttag cgatatcaaa ttgggggaag caccaaagga attattgtga aggagttatg 17220
gggtgcgtgac gttatctgct aggttcaaat ccttgtggct atgaatatit atctgctagg 17280
ttcaaatcct agtgactatg aatattaatg ggtaaggtaa gggatttatt gttaatttta 17340
gtttctttta gattgtgcca tcggacgcca ttcggtaact gtaataatgc tttgtattgg 17400
attcacttgt gttacatgca cgcactaac atgtgcttta ccttttcac tgtttttgcg 17460
ttctgggcta gaaactcaaa cgttgaattt tccatggtct gctcaacttg acaattactg 17520
cgtgtcaagc gatcttatac gcatactatg cgcacaagt attgtatacg gatatgatga 17580
cagtataacg tgtgatattg atttttttta taaaaaatg atgttccttt ccttgatgaa 17640
ggaacaaaga ctttttttaa aagaagggtt ttactaaaaa caaaaatgac aaaaacaaaa 17700
tatcagtgca catggcaagt gtgctcgga attttttctc tgtactttaa acaaaaatac 17760
ttctatatgt tcttttttat aagggtggca caaatctttt aaatgagcca aatatctaca 17820
ttggatttat taaaaactgt ataaattata atttatactc tgaaagggtg tgtgcatctc 17880
tcttgagaa aatgtataag ttgcaacaa acattaatcc acgttatgta actttttttc 17940
gccggaaagg ccgaaggagg cctgacggag cgtggggctc ctcaccggga gaccgcgag 18000
gcccccttt gccgggtcgg ccggggactc agggtgaaat tctaagctct ctgtatgtgg 18060
aaggttcgcg accgtcgaaa gagcataaga cacgggcgat gtatacaggt tcgggccgct 18120

gagaagcgta ataccctact cctgtgtttt ggggggatct gtgtatgaag gagctacaaa 18180
gtatgagcca gcctctccct tgttctgggt tccgaatctg gaaaagtcca gtccagtccc 18240
cccctctaag tgggcaaggt cctcctttta tatcttaagg ggataccaca tgcaccatct 18300
ccctcctttc tgtggggact taccctacct tttcataaat ggacggagat ttgtatagtt 18360
gccgtccgaa tgaccttctg ataggacggc ccatacctac ctccacttcc gccgaaagca 18420
ggtgcgacgt gggattatgg ctgtctgctg acgacatgac cagtgtcaga ctggtcacaa 18480
attgctcatt cctgtccacc acgcgtcagt ttagcaatct acatgttggc cttctttcac 18540
acaacatctt gcctgtaatg gttaggatga agcctggcat atatctaacc aggactaacg 18600
tgccatctct aggaggtaac acgctagctc cagctgggga cgagcgccta gaagccctcg 18660
tcctgacggg atggggcgag gcgtgcgtca gatcgctgt cgccacctaa cccgcgatct 18720
gaccggtctg tgactgggtca cagaccggat aaacgagtg actgcacttc gttacatgcc 18780
gcgtgacacg ctacgcaaaa ccgcaataaa tgtggttagg tgagccccgc tgtgtcacc 18840
taaccatac acgcggagca aaaaccacg aggggtcggg gcgcctcggc ctcggggcc 18900
gaggcgggtg cgggtccgacc ccctcggggg gactaagagg agggcgaaca catcaccctc 18960
gggcccgcg tccccgagg gtgccaggcc acgtgggcga ttgtgtctgc ctcaaaccctc 19020
tagtcatgat actcctgatc ccatgtcacc gacagtagcc cccggcggtta tgccaggcg 19080
atcgccctct ttaagggaag cggtcgggcg tgacgccact cctaaggcct ggtgacaggt 19140
gggaccggtc tccacaattg ggcagaaacc caacggtcac aaatcacgca catcggcaat 19200
ggtaactcta ctatcaataa tgagcgggtc cttcaagact gccacattac tcgagtagca 19260
cacgaatctg gacatggcga ttcgtttcgt ctggagatat ggtaacgtcg ctttggtcgg 19320
cgagcgtaat taacgcgcgc acgatatgat ctatctcgac tgccacaacc gcatatccac 19380
ctcatgcgcc gcaagcgggc gaatgggatt agtggaaagc tgggcgcgag aaacgagggg 19440
gcgaaatagt gggcgcgaga agcgaggagc cgggcacagc gttggcaaga gtataaaggc 19500
actgaggaaa ggatctgttt ccttcctttc gccatcattt cccttgtctt cgccgcttgc 19560
gccctaactc cttctttcct gtgctctact ttcgccacac gcgctcgctc tcaatcttct 19620
cttcctccgg cgccatggca cggggctccg ctctgctcga tggtagcgtg ctgccgcctt 19680
cccgcatcgt gagcgagagg caggctgggc tgccgcgccg cttcatgccg gaatctgcca 19740
ccggccggga gatagtcacg ctgggtgagg gacgcccggc gccagactac ccggggcggt 19800
ccgtcttctt tctccccctt gcaatggcag ggctggttcc gccattttct tctttcttca 19860

tggatgttct gaagttctac gatctccaga tggcgcacct caccaccaac gcggtgatga 19920
cattggccat cttcgcgcac ctgtgcgaga tggtcatagg ggtgcgcca tctcttcggc 19980
tgttcgggtg gttcttcacc gtgcagtcgg tgctgcgcgc atcggtagtt ggtggctgct 20040
acttcagacc atggggggcg gtgctgaatc gctacatccc ctgcgcctc cgcaagaagt 20100
gggacgactg gaagagcgac tggttctaca cccccctcgc cgacgaagcg cgcctctgac 20160
ttccgagcca gccccggcg caggcctcca gctggcgggc gccggtagat ctgggggatg 20220
gctatgacgc cgtcctcgac cgcctggcgg gcctacgac ccaggggctc acaggggcca 20280
tggtgtacgg cgactacctc cgtcgtcgga ttgcgccgct ccagcggcgc gctcggggcg 20340
cctgggagta caccgggtcc gaagactaca tgaggacca ccagggagtc agatgggact 20400
gggctcctga ggatttcaag atagtgttcc aacgggtgct gaatctcaac tccatggagg 20460
cgtccctcat tcccaagga atcctcctc tctgcagcga tccagaccgc gcctccatcc 20520
tgaccattat gacggcggtc ggggcctcag aggagttagc tccaaagggc cagcagggcg 20580
caggcgggag ccgtaggggg gatcaatcta cccggggagg gggctcgtgct tctgggtctc 20640
gcgacggagg cccgaggagc agccgccctg ccgacggcg ggggaagagg aagcaggag 20700
gaacacctcc cccatctcct ccccgagggg gcggggcggt gcgtgccaac agcaggcgcc 20760
cggagggggc cgcgccgaca tcgcagcccg agggggagcg caagaagaag cggctccgca 20820
agatggggga gacagaacca tctcggggaa acctatttc cctccaaag tggctgttta 20880
accgaccccc tcgcaggttc gtctctcacc catcgtggct gtattcattc tctcaacgcg 20940
agttttact caccatctt gtctgtcttc tggctctttc ttctgtttca gcgagatccc 21000
gtcgcgtccc tccgcccatt ccaagtccgg ccagtctgag gccgaggatc cggcggccgc 21060
agaggcccgg aggcgggaat ctgaccggcg agaggccgc gatcgcctac gggaagccga 21120
ggaggccgcc caggaggccg cccgggctcg ccagggcgag gaaaccgctc gggaggaggc 21180
cgcccgggcc cgccaggccg aggaagccgc tcgggaggag gccggccgag cccaccaggc 21240
cgaggaagcc gctcgggaga aagccggatt tcgccaggac gaggcaatgg cgacttccga 21300
ggcagctcgc gatgaggtcg cgggcgcgct gcttgagccc gcttcctcgg gcgacgctca 21360
ggcgacaact tccggggcag ctggcgacga ggctgcgggc gcgtcgcttg ggcccactcc 21420
ctcaggcgac gcccaggacc aaccaggtct gagggacatc cccgagtcg gcacttccat 21480
cggcggcccc agccgcgtgg catcctctcc aaggcggctc ttccccacgc cttctatcgc 21540
cccgctgagc gcagagcccc ttctgcaggc cttggccgcc gcaaaccatc cggtgttgga 21600

cgggcttagt gccaggtgg aggccctgca agcagagtgg gcggagctcg acgccgcgtg 21660
ggcgcgtgtc gaggaggggc ggcgctcagt ggaggccatg gtggagggtg gccgcaaggc 21720
acaccgccgg catgtctcgg agcttgaagc ccgtaagaag gtgttgccgg aaatcgccaa 21780
ggaagtggag gaggagcggg gggctgccct cattgccacc agcgtgatga acgaggcgca 21840
ggacaccctc cgccttcaat acgggagctg ggaggcggag ctagggaaaa agctcgacgc 21900
cgcccagggg gtgcttgacg ttgccgctgc ccgagaacag cgggcggggg agaccgaagc 21960
ggcgtcccgga cggcgcgaag agacccttga ggcgcgcgcc atggcgttg aagagcgcgc 22020
ctgcgtcgtg gagagggatc tggcggaccg cgaggccgcc gtcactatcc gggaggcaac 22080
actggcggcg cacgagtccg cctgtgccga agaggagtcc gcactccgcc tccacgagga 22140
cgcgctcacc gagcgggagc gagctctcga ggaggccgag gccgcggcgc aacggctggc 22200
ggacagcctg tccctccgcg aggcagcgca ggaggagcag gcgcgccgca ctctggaatg 22260
tgtccgcgcc gagaggaccg cactaaacca gcgggccgct gacctcgagg cgccggagaa 22320
ggagctggac gcgagggcgc gcagcggcgg ggcggctgcg ggcgaaaacg acttagccgc 22380
ccgcctcgct gctgccgaac ataccatcgc cgatctgcag ggcacgctaa actcgtccgc 22440
cggggaggtc gaggccctcc gcttggcagg cgaggtaggg cccggcatgc tttgggacgc 22500
cgtctccgc ctagatcgcg ccggtcggca ggtgggcctc tggagagggc ggaccgtaaa 22560
gtacgccgcc aaccatggag gcctcgccca gcgcctctcg aagatggccg gggctctcca 22620
acggctcccc gaggagctcg agaagacaat taagtcatcc tcgagggacc tcgccaagg 22680
agcggtgag ctcgtactgg cgagttacca ggccagggac cccaatttct ctccatggat 22740
ggcgtggat gagttccctc ctgggaccga ggacagcgcg cgcgaggtc cgggatgccg 22800
ccgaccatat cgtccacagc ttcgagggt cagcccctcg gctcgcgttc gccccaaact 22860
ccgacgagga ggacaatgcc ggtgggtgcag acgacagtga cgatgaggcc ggcgaccgg 22920
gcgtatcgga ttgatcccc aagccccgc cattcttcag tttttcttc tttcttct 22980
tctaaggcct tcgggcctct tttttgtata gatcaacta atctgtaatc aaaaatgaag 23040
aaattttgt gtcaatttca tcttgctgtg tgtatgagat gaggatgatc tgtgacgtg 23100
tccttttgcg tcttagcttg attaagggt cgtgcccagg tcccagtcct caaaaggcgt 23160
gggtcggggc tagtgccctg ggagatccac atgtcgagac tggccaggcc gggaacgtg 23220
tgaccgaggg ttatgggtga ccgattgtg ggtttttgcc gattcccccc cggagttcac 23280
cacgccccgg ggcacggctc ggttctgggc cccgtttggc gatttttagcc gaccgagcc 23340

cccgagggca ggattgagca cgagtgcctt atttcaagtc aagattcttc aaaaggaaaa 23400
aaaaacacag atacagcctt taggaaattg aaactgcttt tattgaaata ctgaaataag 23460
agaaataaga atgtgcatgt gtggcagccc ccggccaacc ctgcacgccc gagggggtgc 23520
gggggttgcc cgagcccgaa acctgacacc cgaccccccc cctcaggggt agaagcgacg 23580
aaggtgttcg atgttcacg ggtaggcag ctcaatgccg tcgcccgtgg ccagccgtat 23640
ggagcccggc cgggggacgc cgaccactcg atacggaccc tcccacattg gtgagagctt 23700
gctcaatcca gcacgcgttt ggacgcggcg taggacgagg tcgtcgacgc agagtgatcg 23760
ggcccggacg tgacgtgat ggtagcgcg caggctctgc tggtagcgcg cggctctgag 23820
ggccgcgcgt cgccttcgct cttccaagta gtcgaggtca tctctgcgaa gctgatcttg 23880
atcagcctcg cagtacatgg tggcccagg agacctcagg gtgagctcgg atgggagaac 23940
cgcttccgcg ccgtagacga ggaagaaagg cgtttccccg gttgctcggc ttggtgtagt 24000
tcggtttgcc cagagcaccg ctggcaactc ctcgatccat gaatcgccgt gcttcttgag 24060
tatgttgaag gtcttggttt taaggccttt gaggatttct gaattggcgc gctccacttg 24120
gccattgctt ctgggggtggg caggtgaggc gaagcagagc ttgatgcca tgtcttcgca 24180
gtagtcgccg aagagttcac tagtgaattg ggtgccatta tccgtaataa tacggtagg 24240
cactccaaac cgggccgtga tgcccttaat gaatttaagt gcggagtgtt tatcgatctt 24300
gacgaccgga taagcctcgg gccacttagt gaacttgctg atcgcgacat acagatactc 24360
aaaccgccc ggggcccgc taaacggtcc caggatatcg agccccaga cagcaaatgg 24420
ccacgaaagt ggtatggtct gcagggcctg ggccggctga tggatttgct tggcgtggaa 24480
ttgacacgct ctacatcgcc ggaccaggtc gaccgcatca ttgagagctg tcggccaata 24540
gaaaccctgg cgaaaagctt taccaaccaa ggtgcgcgag gcggagtggg ctccgcattc 24600
gccttcattg atatcgcaa gaagcacaac gccttggtcc cgaggaatgc acttcaggag 24660
gattccatta gccgcgcgcc gatagagggt cccttctacc agcacgtagc gtttgagat 24720
gcgatggacg cgttcactcc cttegcggtc ctcgggtaaa gtcttatctg tgaggatgc 24780
ttgatctcg gcaatccaag caatcaatct aaggagctg ggagcgctcc cctcgggtcc 24840
cgaggcctgg acttcaacgg gcctcggggg ccggtcaggc gcgtccgtct cccctaaggg 24900
gtcgggtcgc gccgacggct gggcaagcct ttcttcaaag gcgccgggtg gggctctggc 24960
tcgctggac gcgagccgtg agagttcgtc ggcaatcatg ttatcccgtc tgggcacatg 25020
ccgaagctca atcccgtaa aatggcgctc catacgccgt acttggcgca cgtaggcgtc 25080

catctgcggg tcagagcacc ggtactcctt acagacttgg ttaacgacca gctgggagtc 25140
gcctaacacc aggaggcggc ggatccccag tccagctgcc actctgagtc cggcaaggag 25200
tccctcgtac tctgccatat tgttggtcgc tcgaaagtcg aggcggaacca agtatctgag 25260
gacgtctccg ctcggagagg tcaacgtgac ccccgccaccg gcgcctgaa gagacaggga 25320
gccgtcgaac tgcattacc agtgggcggg gtgaggcagc tgcgaggggt ccgtgctggc 25380
ctcggggatt gagacgggct cgggagccgg ggtccactct gccacaaaat cggcgagagc 25440
ctggctcttg atagcgtggc gtggttcaaa gtgcaaatcg aactcagaaa gttcgattgc 25500
ccatttcacc acccgtcctg taccgtctcg attatgcaag atttgaccga gggggtaaga 25560
cgtaaccaca gtgaccgat gcgcctggaa ataatggcgc agtttctctg aggccatcag 25620
aatagcgtaa agcatcttct gggcctgagg gtatcgggtt ttggcgtccc ggagggcctc 25680
actaacaag tagacgggcc gctgcacctt tcgggtgggc cgatcctctt cgctaggggc 25740
cgcatccctg gggcactctt cgtccaagca gcctcgcggg gcgcacttgt cttctgtgct 25800
gatgacctcg gggtcggagg ataacagggg cggccttccc acagtggctt tggggccgtc 25860
ctgggggtca ggggctcctg gcgtcgtcgg acaagcgggc aaaggccaa ctccggtcgt 25920
caggggcctt aggcctccgt tcggctcggg ggctcttctt ccctgctctt tcccgggtcg 25980
agtcagcaca gggttagcct cggggtcaaa gggcgatagg tgcggccttc ccacagtggc 26040
ctcagggcct tcctgggggt cgggggctcc tagcacgctc tgacaagcgg gcagagggcc 26100
aactccggtc gtcgggggcc tcgggccacc gttcggctcg ggggcctctc ctccctgctc 26160
tctcccgggc caagtccgca cagggtgggg aagcgcgaaa tgagaattgt cctcatcgcg 26220
ctccacaacc aatgccgcac taactacttg cggggtcgcc gctaagtaga gtagcaaggg 26280
ctcgtctggc tccggggcga ccagaactgg gggagagctt agatagcct tcaactgggt 26340
gagggcattt tcagcttctt tcgtccaggt aaacgggtccg gagcgtttga gaagcttaaa 26400
taagggtaac gccttctctc ccagcctcga tatgaaccga cttagggcgg ccatgcaacc 26460
ggtgacgtat tgcacatccc taagtttgct gggggggcgc atccgctcta tagcccgtat 26520
cttctcgggg ttggcctcaa tgccccgggc agagaccaag aacccgagaa gcttgcccgc 26580
aggtacaccg aacacacact tatcggggtt taattttatg cgggcggagc ggagactctc 26640
aaaagtittc gctagatcta tgagtaacgt ttcttggttg cgcgtcttta caaccaagtc 26700
atcgacataa gcttcaatat tacgtcctaa ttggctaccc aaagaaattc gagtagtacg 26760
ttgaaaagta ggacctgcat tctttaacct gaagggcatt gtcgtataac aatagggtcc 26820

tatgggggta atgaacgcag ttttttcctc atcctcccta gccatgcgaa tctgatggta 26880
accagagtat gcatctagaa aacacaaaag gtcgcacccc gcagtggagt cgacaatctg 26940
atctatgcga ggcaggggggt aaggatcctt aggacatgcc ttgttaaggt cgggtgtagtc 27000
gatgcacatc cgaagcttgc cgttcgcctt gggaacgacc accgggttcg ctagccactc 27060
ggcgggggtt acgctgccat catatttttc ggcatgggtg ggccggaacc ttggggggcca 27120
acggacattc cgaagactcg ccacaaaggc tctacagccg acaccaccaa ccggggggcac 27180
ggagggctga ttcccgcgtc cgtgttgagg tgacactctg gacgaggaag cgccctccgt 27240
tgcgtgggca gcacttcggt cattacgccg gcgctcgatg ctggtgcggg cgtccggccc 27300
cccacgcaga tctttctggg tcgaaggagt cgacgaagga gtggcgggccg aatggcgaac 27360
agcggctgcc gctcgtcgtg ccctccgtct tgacgacgcg gagccggtgg tagcagcacc 27420
agaggccttg gtggcggagg accgcccacc agcatctagg cgctgccgta ccgtcatgac 27480
taatttggcc acgtcgtcca gccatcgtt ggctggagac tccgggtcag ggacgacagg 27540
cgggtgacgt aagagcgcgc ccgcagcttg gagcgcgccc tggggcgtgc tgccgtcgcc 27600
gtagacgagg aggcgacgct ccccatctcg ccgttcttct ccatcgcccg cgatcgggtga 27660
agtcgcggat ctttcgaccc tctcgagcgc ctccccccgc ttaggacttt ggcgtggagg 27720
gagcgggtgga gtacgagctc gacggcgtgg gttcggtccc ccgtcgtcgc cactcacact 27780
cggagagagg tcgtgcgcct ttgcttgctc ggccatcagg ctgaacagga aaagcttggc 27840
gcacacggaa gagtacgaga gctcagaaaa acacacactg agtcccctac ctggcgcgcc 27900
agatgacgga gcgtggggct cctcaccggg agaccgcgca ggccccctt tgccggttcg 27960
gccggggact cagggtgaaa ttctaagctc tctgtatgtg gaaggttcgc gaccgtcgaa 28020
agagcataag acacgggcga tgtatacagg ttcgggcccgc tgagaagcgt aataccctac 28080
tcctgtgttt tgggggggatc tgtgtatgaa ggagctacaa agtatgagcc agcctctccc 28140
ttgttctggg ttccgaatct ggaaaagtcc agtccagtcc cccctctaa gtgggcaagg 28200
tcctcctttt atatcttaag gggataccac atgcaccatc tccctccttt ctgtggggac 28260
ttaccctacc ttttcataaa tggacggaga tttgtatagt tgccgtccga atgaccttct 28320
gataggacgg ccataccta cctccacttc cgccgaaagc aggtgcgacg tgggattatg 28380
gctgtctgct gacgacatga ccagtgtcag actggtcaca aattgctcat tcctgtccac 28440
cacgcgtcag tttagcaatc tacatgttgg cctttcttca cacaacatct tgctgtaat 28500
ggttaggatg aagcctggca tatactaac caggactaac gtgccatctc taggaggtaa 28560

cacgctagct ccagctgggg acgagcgcct agaagccctc gtcctgacgg gatggggcga 28620
ggcgtgcgtc agatgcctg tcgccaccta accgcgac tgaccgggtct gtgactggtc 28680
acagaccgga taaacgagtg cactgcactt cgttacatgc ggcgtgacac gctcagccaa 28740
accgcaataa atgtggttag gtgagccccg ctgtgctcac ctaaccata cacgcggagc 28800
aaaaaccac gaggggtcgg ggccgcctcg ccctcggggc cgaggcgggt gcggtccgac 28860
cccctcgggg ggactaagag gagggcgaac acatcacctt cgggcccac gtccccgag 28920
gggtgccaggc cacgtgggcg attgtgtctg cctcaaact ctagtcatga tactcctgat 28980
cccatgtcat cgacaaggcc atccgaatgt attaaggagt aaaagttaca agaaaaaaca 29040
ccacaatgca ccaaggtgca tgaccacaca ccatacacta ccccaagca caaaccactg 29100
agggtgaagc ctagcaccaa acgaccgcca ctaagtgtga ccaaagccg ctaggcctac 29160
ggcagcaaca catagatgag acttcgaaaa cgatgccacc aagggtgtca cgacatgtag 29220
gatgtgccca tcgtccatct aaaaagatgt ggttttcacc cagagaaact catcaagaag 29280
gggagagggt aacccttgac agcgcctcaa ggaggttacg acgcccgaag gcgtagccgc 29340
tgccgggtccg gtgaaccacc ggactaggct tccgcctagg accctatagc cttgatcgca 29400
gatcaccgtc caccactcag aaccaccaca cagacaaaag gtagcacgta gcttccaccg 29460
caccgcaccg acgccccttc gtcggccgac tccatcgaac caccatcct gagagctggc 29520
ccaggacccc tccgttccac caccgcccgg ccgccttgcc agttttggcc aaaggagaac 29580
ccgggactgg gtgacattgc ttcggcagcc tgagcttccc ccgctggcga gctgctgtct 29640
caatccaacc tagaaactcc ccgaaaaga aggggatgag ctctaggaag ggcgagggtg 29700
ccgaccggca acgaggaaga caaccatcg actccagctc cttttgact accatctggg 29760
cctgcgcaa tgccggatac gctgtcgctc cggtccggc gccaccacc tgcaccct 29820
ttgcctggtc tccgcgcccc tctgggtgc gtcgcgccg ccagctggcc gctaaggga 29880
ccacgacggc cgcccggcta ccgaggcctg gccgcgccat gggacagctc gcgctggcac 29940
cagcgagcca cggccgtcgc gctgttgccg gcgccagcga gcacaaccgc cagctccaag 30000
ggccgagcat gccactgagc cgccgcccgt gcccccggg ccggctgcac gtcaccggcg 30060
cacagaccg cacgcgcca cgctccgct ccgcgccga ggcagccca tgccattgcc 30120
gcgcacctc cccgcccgt gccgagccgc caccgcgcac cttgctgagc cgccaccgcc 30180
gtccctagcc gcctcgtgcc gccgccacgc cagatccagg cgcgggatgg ccgatccgg 30240
ccttgggggc gccggatccg ccgcctcccc acaccgccac ggcgtcacca cctccgaccg 30300

cagtgagggc ttcgtcgttt gcccacccct catcgcgctg aggaggaaga cgccaagaaa 30360
aaagggcctc gccgctgcct tccttgctcg ctgccggctt cgccgccggc gagctccggc 30420
ggcggcgagg tgggggagaa gaagtgggga gtgggcagct aggggttttt cgcccccaa 30480
gccgcccgtg cgagagcgac ggtggggggg gggggacttt ccaacctctt ccagtgttct 30540
agttctccac gttatgtaac tcaatttggt taaccataga aagtaagaaa cctaccagcg 30600
tgtaagctc tctttcattc cttttcttct tcctggtttt gtttccatca catgtcaagt 30660
gaagggttct taactacat tactcctaca catctaattt ttttctcaga tctttcgag 30720
gtatatattg atgctacatt ttatgatctt aagataatct ccttcacatt accctctgct 30780
gaaactttag ctggaaccgt catcttcacc acaatttgag cccaatttgc acagagcaca 30840
acgagcaata gcttgccctt acgttcatta ttagcatga actactacta actaccaag 30900
aatcaataca ccggtttaat aacgccattt taccacgta atatatgttt cattcaacac 30960
accggttttg gcacagttgc aaacttgcaa taaattcttt cctacttctc catcccataa 31020
tataacaaat tggatatgtc cgtctggtac taagtgtcta tattatgaga tggagggagc 31080
acttcttttc ttccaaaata taagaatata gtattggatt agatattatc tagattcacg 31140
aattcgatta ggttgtctag atttatagtt gtatgtaatg tataattcgg taataggta 31200
ttacctctcg ggatggagg agtagtttg actttttttt ttcttataaa tcgctttgat 31260
ttttatatta gtcaaatttt atcgagttta actaagtta tagaaaaaaa ttagcaacat 31320
ttaagacca cactagtctt attaaattta gcatggaata tattttgata atatatttgt 31380
tctgtgttaa aaatgctgct atatttttct ataaacgtag tcaaatttaa ataagttaga 31440
ctaaaaaaaa tcaaacgac ttataatatg aaatggagga agtagtagac tataacaaat 31500
ttaaacctg ctttgatttt agagcatcac taatatgta gcaataatct atccctaaaa 31560
tttatttttt ttctaaact gaaaatagga agtggaaata ctctccatc taagagagag 31620
cctaaattca ataaaaaact aaaaaactaa aggtggatcc ctctattaaa ctaccgcaa 31680
aaatttatgt ttttttctc ttccacgcgc gcagaacaga tatctcgatc aagttagcat 31740
gtaaaatttt taaagagata cttatacga ctcttccgt atttccaaaa gcaaaccgat 31800
ttaaaatctg actcaataa agatctatat atccaattta catgacacat gtttcgccga 31860
atttttatat taataataat taatattttt aaaattaaat tattagcaat ttgtttggag 31920
gatttatcaa aacaggatgg acgttgttta taacagcgtc tagacctaga cgcgcttgca 31980
aactgcggcc acccttttat cacacaaatt ttgacaatt tgacactttc caaaaattaa 32040

ttttataaat taaccgtgac caaaacttat ttaaaaataa tctttttgtt gagcgcaaaa 32100
tcgtatactt cagcgccaaa tagcacggcg ccgacctccc ccttcccctc ccctctatcc 32160
tccactgctg ccgcccacct ctccgtatca gctgcgtcgc gttggtttcc gccggcgctg 32220
ctgctgctgc accagtccgc tagggcgggc gggcatggcg cgccgcgccg cttcccgcgt 32280
ccgcgccggc gctgttggcg cccttcgctc ggaggggctcg acccaagggc gagggggccg 32340
cacggggggc agtggcgccg aggacgcacg ccacgtgttc gacgaattgc tccggcgtgg 32400
cagggggcgc tcgatctacg gcttgaactg cgccctcgcc gacgtcgcgc gtcacagccc 32460
cgcgccgcgc gtgtcccgt acaaccgcat ggcccagacc ggccggcgcg aggttaactcc 32520
caacttgtgc acctacggca ttctcatcgg ttctgtctgc tgcgcgggcc gcttggacct 32580
cggtttcgcg gccttgggca atgtcattaa gaagggattt agagtggacg ccatcgccct 32640
cactcctctg ctcaagggcc tctgtgctga caagaggacg agcgacgcaa tggacatagt 32700
gctccgcaga atgaccagc ttggctgcat accaaatgtc ttctcctaca atattcttct 32760
caaggggctg tgtgatgaga acagaagcca agaagctctc gagctgctcc aatgatgcc 32820
tgatgatgga ggtgactgcc cacctgatgt ggtgtcgtat accactgtca tcaatggctt 32880
cttcaaggag ggggatctgg acaaagctta cggtacatac catgaaatgc tggaccgggg 32940
gattttacca aatgttggtta cctacagctc tattattgct gcgttatgca aggtcaagc 33000
tatggacaaa gccatggagg tacttaccag catggttaag aatggtgtca tgcctaattg 33060
caggacgtat aatagtatcg tgcattggta ttgctcttca gggcagccga aagaggctat 33120
tggatttctc aaaaagatgc acagtgatgg tgtcgaacca gatgttggtta cttataactc 33180
gctcatggat tatctttgca agaacggaag atgcacggaa gctagaaaga tgttcgattc 33240
tatgaccaag aggggcctaa agcctgaaat tactacctat ggtaccctgc ttcaggggta 33300
tgctacaaa ggagcccttg ttgagatgca tggctcttgc gatttgatgg tacgaaacgg 33360
tatccaccct aatcattatg ttttcagcat tctaatatgt gcatacgcta aacaagggaa 33420
agtagatcag gcaatgcttg tgttcagcaa aatgaggcag caaggattga atccggatac 33480
agtgacctat ggaacagtta taggcatact ttgcaagtca ggcagagtag aagatgctat 33540
gcgttatttt gagcagatga tcgatgaaag actaagccct ggcaacattg tttataactc 33600
cctaattcat agtctctgta tctttgacaa atgggacaag gctaaagagt taattcttga 33660
aatgttggtat cgaggcatct gtctggacac tattttcttt aattcaataa ttgacagtca 33720
ttgcaaagaa gggagggtta tagaatctga aaaactcttt gacctgatgg tacgtattgg 33780

tgtgaagccc gatatcatta cgtacagtac tctcatcgat ggatattgct tggcaggtaa 33840
gatggatgaa gcaacgaagt tacttgccag catgggtctca gttggaatga aacctgattg 33900
tgttacatat aatactttga ttaatggcta ctgtaaaatt agcaggatgg aagatgcgtt 33960
agttcttttt agggagatgg agagcagtgg tgttagtcct gatattatta cgtataatat 34020
aattctgcaa ggtttatttc aaaccagaag aactgctgct gcaaaagaac tctatgtcgg 34080
gattaccgaa agtggaaacgc agcttgaact tagcacatac aacataatcc ttcattgggct 34140
ttgcaaaaac aatctcactg acgaggcact tcgaatgttt cagaacctat gtttgacgga 34200
tttacagctg gagactagga cttttaacat tatgattggt gcattgctta aagttagcag 34260
aaatgatgaa gccaaggatt tgtttgacgc tctctcggct aacggtttag tgccagatgt 34320
taggacctac agtttaatgg cagaaaatct tatagagcag gggttgctag aagaattgga 34380
tgatctattt ctttcaatgg aggagaatgg ctgtactgcc aactcccgca tgctaaattc 34440
cattgttagg aaactgttac agaggggtga tataaccagg gctggcactt acctgttcat 34500
gattgatgag aagcacttct ccctcgaagc atccactgct tccttgtttt tagatctttt 34560
gtctggggga aaatatcaag aatatcatag gtttctccct gaaaaatata agtcctttat 34620
agaatctttg agctgctgaa gccttttgca gctttgaaat tctgtgttgg agttcttttc 34680
tcctacagtt gtattagagg aggatcttc tctttatgtg taaatagcga ggtatgtatg 34740
tcacctctcc gaattatttt tactctgggt cctagacggt aaacaagcaa ttatgttctg 34800
cctttgatgc cagaaaaaac acaaaagttt gtcgttatct ctactaacgg atcataaagg 34860
aatttgtaac tggagtttca aacttaattt gtctaggcag tagttttggc attagatcca 34920
acattgtgta ggattcattt gtgtgtatca atctataggg tttcattaaa tttcgtaaat 34980
gtgtactgtt taggtgttga atagtttgac ttgtttttta actgaacaaa agatactgaa 35040
atcgttccat tcaacaaaca catgttccgt taatgaaatt attgtacgtt accttttgtt 35100
ttcttactca caagtgtcct cttttcttat atcctataga ttggtacaac aaattattga 35160
ttcaattttg gttttgaaca ttgatgatcc tccctgcact attggtgcag ctgctcttct 35220
attcattttg tgaagtgatg tgagtacctc tcaatcccat ccttatgctt ctgtgcatgc 35280
ttcattccaa ttttttacgc atatcgattg ttttctttta tataacagtc cataaagata 35340
atcacatcat gacaaagtta tttatttcta cagtatagtt atataagtat tcaccagttt 35400
tccatgaata ttttggcatg tgattacaaa gaagattatt tgagaaaatc catgctttta 35460
tttcatcttt ttgtttgaag ttgaacttta atttatggtg taaatttcag ttattattgc 35520

tagcagctcg tactctttaa tggataaact tcacttgtgc ttattctcca atatctccct 35580
tcttgttggt caggttcaag aaaatcattt gttggattca gaatctggtg tccattttct 35640
tcttaaatta ttaaatectc cagtgaatct tgttgattcc aaagcaccat cgatagggtc 35700
caaacttctt ggaatcagta aagttcaa at gcttaatgga tcaaataagg attctgactg 35760
catttcagag gaaatccttt caaaagtga agagattctc ttaagctgtc aagtgatcaa 35820
gtcgctcgac aaagatgaca agaaaacaac aaggccagaa ctgtgtccaa agtggcttgc 35880
tttgttgaca atggaaaatg catgcttgtc tgctgtttca gtagagggtg agttttaatc 35940
aaatttcttg gtcattgattt ccttttatga ccattatatt tatttatatg agccaaataa 36000
gcagttgtca acttgtcata agttacatag cacctatttg caatattcat ggggtggttg 36060
cttagccctt ttcttcacct gcttttgatt gatgacttcc atctgtgttg cagaattgaa 36120
ttggagtagt ggactgcact agaagcacct atggccattg tcatactagg aaggttttcc 36180
cttatcaaat atttgattgt tacagagact tctgacacag tgtccagagt tggaggaaat 36240
tttaaagaga cattaaggga gatgggaggt cttgatagta tttttgacgt tatggtggat 36300
tttcattcaa cattggaggt gagatctcgc taacatcgca tattttacat ttccttgggt 36360
caactcta at ggattgtgca ggcttgttcc ttttcgccat ttttagcttta atgtgcttga 36420
agccacatga aagtaatgct tgtccagata catagccaaa ggttgttata ttttggggca 36480
tggaaaatgc ttgaggtagt aactattttc atcaggacat ggaaaattgg ctgcaacaca 36540
aattatgttg ttttatgttg caaaaatagt tttttaatac ttttttattc tgcattgtgt 36600
gttagtatct tacagttcct ctgatgatta tatccccac gataataaca cttgaaacga 36660
taataacact tgacatatct acaccaagtg aacattattc atttggtatg tacttttcca 36720
gctatacttg ctgttcttgc atgtgtaagc aagtttgag taaattgcgc attaattta 36780
atgcttggtg ttcctatctg tgtacttttt attccccaac taataatgca atcatattac 36840
gctgataaac tgaataaata aattaaca at acttcttg tggcaaacct tgtgtatcag 36900
aatctcataa aggatacatc cacttcagct ttggaccgaa atgaaggaa atctttgcaa 36960
agtgtgtc tcctcttgaa atgtttgaaa atattggaaa atgcatatt tctaagcgat 37020
gataacaagg taatgtcct tatatgttct gtttcagttt agtaccatt tccttcttct 37080
gtactatctt ctctcctgat ttgttctgtg caaaatgtgc aaacagtgcg actttgtatg 37140
tctgttaac aattttcttt tcttcctgaa aaagcaatat gaactcttac attcattttg 37200
cttcttgacg acccatttgc ttaatatgag tagaaaattg aaccgaaac gtccttgct 37260

ttcttttggt ggtgtcatta tcaatactat tgagttatta tcaggtattt ttcttaataa 37320
tacaatgtgt tcgctaacac aataaaatgt tttaaaccatc cagtatgtta aagttgcagt 37380
ctgacgccta ttttggtttg ctgcagctct ttcaatactt .cagaattctt ctgttgtttc 37440
cagctctaca tatccgaaat cgtctaaagt ctctcaacag agttactctg gtaataacaa 37500
acaccaattt tgtttgatca gttgatctcg ttggcttttc tatgcaactgt ctcaatatag 37560
tttggtcgcc attcaagtct cactacagat gttgaacttg gcctgacacc aaatatttat 37620
aaaatgctac ctgatatttt taatatttca tgtttcctga cccagattat cttgttggtt 37680
cctcgataaa gtttaattag tgacattctt gaagctttgt tatgcagcag atgtcatggg 37740
gggaacttca tttaatgatg gaaagagcaa gaactcgaaa aaaaaaaact tttgtcgaa 37800
cagacacgtc attgttgctt atcttcaaaa tcagaagttt ctcatattac tatatcttct 37860
ggtagtgatg ctggtctgtc acagaaggca ttcaattgtt ctccatttat atcaagcaat 37920
ggggcatcaa gtggttcatt aggcgagagg cacagcaatg gtagtggttt gaagttgaat 37980
ataaaaaagg atcgtggcaa tgcaaatacca attagaggct caactggatg gatttcaata 38040
agagcgaca gttctgatgg gaactccaga gaaatggcaa aaagactccg tctatcttaa 38100
aatgtaatca ccgacagtgg tgggtggtgat gacccttttg catttgaccg ccgcgtcgcc 38160
gtcgccacca cgtaatcgcc cagctcgctg cccccgtgc cagctcgctg accgcgcacg 38220
gtaatcacac gcatctcgag gccgccgcta gctgatatct tctcatccgg ttgatttggt 38280
attttggcgt ttttgcatg gtgatggcg ggggcgaccg tggccgaggc gtggagtgcc 38340
atccgcatca ggggtgatcg gccgcgtgc tccgccctgg tccgcaggct ttggcgcgca 38400
gctggcgcg gagggagact gtggtgagat cggatttcgc cgctgggtgt gtcgctacca 38460
tgggggattc gccgcaggcg ctctcaggtt tgcagcctcc tccactctct tccctttttt 38520
attttttttt ctgcgaaat gtgttgatg gttcgtctcg ctgggcaggc ctcatagcca 38580
ttaatgtagt ttgctggaac atttacattt ggaacgttgt tggcaattgc ttgacaaaat 38640
gtggaattgt ggaggggaga aaaatcattt gaacctgcag tgacaaaatt gccatctcta 38700
attttaaaac tgaagggtgt gaaatcaaac ataatcattg ccagcgcatc attcttggtta 38760
accaccatga tatattgttg gttataacag ttagctccac accaaccttg aagggtgtcaa 38820
tagaatgttt agtataaatt gaggagaaca ggcagttgtt aagactttct aaagaacttg 38880
tagcagctaa tactagctat tgtgcatttg tgtttcatgg aatttgagca gcaatggata 38940
tttcttacta agatgtatga tgcaaaacaa aaaactatgt ctatacagtt tacatgtaat 39000

gtgcggatgc aaataaaatc atgtacatgg acaaactcat gggattcata ccgaattcca 39060
gaattgcatt tcttatgtgg ttacttttgt tgttgatttg gttaccagac atcgatgtga 39120
tttcaagggt cagaggggtt tgcttctacg cggtaggctgc agttgcagca atctttttgt 39180
ttgtcgccat ggttgttggtt catccacttg tgctcctatt tgaccgatac cggaggagag 39240
ttcaggaaaa aaatttgaaa atacccattt ttgaaaaag atttacgttt atatacacta 39300
gtatgaagaa ttgcgaaaa tataactaat ccgcagatcg gttatgcggg agcgcaacaa 39360
aagtatggcg tggcggcgcg gagtggacgg ccgaggcggt cgcgcggaat ggggctgcgg 39420
gaccgagcca gtctcgcttg ccgtaacgc ggaaccggta cgctcccgca gcgccagtgt 39480
gcggaaccgc ggcgccaaca tttttttact gcatggcact gtgtttaata ctgtttgaca 39540
ctgtttctgg tactgtttta cacagttccc gggtcagttc cgcacaatgg aggcgcgga 39600
ccgaccatga acaatgtgtg aacagtgtg cacagggtta aaacagtgt taaactgcgc 39660
tgcacagtgc tggagtcgct ggccactgcg gttccgcgtt ttggaaccgc gggaccgtcg 39720
cgattccgcg ttttgagct gccggaccat gacggttccg cgcaggatcg tcgggtcccg 39780
attttgaatc tgcggaaccg tcgctgtccc gcgtttccgt ttcgcgggat gcgtatattt 39840
ttataaaacc tctccatgca tgtatataaa cataaattat tgaaaaata agtatatttg 39900
caaatttttt tcgagagctc agcactacat tgcaaagatt tgggcaactc tgacaatttc 39960
catgttctac aagcttgacg tcgagggaaat ggagaacctg ccaccgaata gtaccctgc 40020
tatctatgtt gcgaaccatc agagtttttt ggatatctat acccttctaa ctctaggaag 40080
gtgtttcaag ttataagca agacaagtat atttatgttc cgaattattt gatgggcaat 40140
gtatctctta ggagtaattc ctttgcggcg tatggacagc aggagccagc tggtaggct 40200
gtagtctcat ccctgctttc ttaagtagac atatatgcaa ttacagaatt tggtaaacia 40260
acaagatttt atgaatcata tatgattttg gggaaaacac caaactctct ttggtggctg 40320
ccttgaacat agttctattc acacagttat agcaccttct ttaaaatgaa gaactttgtt 40380
gcatacacat atggccaaac cacataatga atttgttta tttctatctt tgaatgtag 40440
caccttattt tcatgcatat catgctaatt tgcttgccca cgttgagtgg gaattttttt 40500
ccatgtttta taatttatat atgttctaga cttctagtcc acaatttatc tacttcatgt 40560
tcctgagcct ctagtatggc tggtagcaga ctaggtgctg agtgctgtcc atttttgcag 40620
actgaagaga ggagaaatac aggactgtcc gttgttagtc agatttgtaa aaatagactc 40680
tgatgtagtt tattttagcc cctattttat atttaacaat acaaatatat aacgtatcct 40740

aagaacttat cgtaatttag gagaagttgc tcgtttcatt aaattaaact gtgaagtaaa 40800
aatgtgtgct cgagtctgtc aatgcaatcc tgtgttcttg tttgaagata tgggtgtaggg 40860
caggctagga tcgaacactg aatggtaaga ctgcttctgc cttcatttgt gcacttggtg 40920
ctgccacgcc gattaagcag tagaacaag taattttgtc gtgcacaaat gagttatatt 40980
tcattgaaaa tcgaagtga aatgaacca aagatagaag aaaaggggaa acttggtaat 41040
tatatactcc acaaatttat tggtaagatt tgatattaga cgctcgatta cttggcttaa 41100
gttaaggata tcaaatttg ggaagcacca aaggaattat tgtgaaggag ttgtgggtgc 41160
ataacgttat ctactagggt caaatcctag tgactatgaa tattaatgag taaggtaagg 41220
gatttattgt taattttagt ttctttaaga ttgtgtccgg gtacaccatt cggtaaagtgt 41280
aataatgttt tgtattggat tcacttgtgt tacgtgcatg tgatttacct tttcatttgt 41340
ttctgcgttc tgggtatgaa tttgacgaga ttccatggtc agctcaacat atcagttact 41400
gcgtgtcaag cgatcttata tggatatgcg acaagcgatt gtatacggat atgacagtat 41460
aacgtgtgat attgatacga tgttcctttc ctttataaag gaacaaagac ttttttaaaa 41520
aaaagaaggg gtattactaa aaacaaaaat gtcaaaaaca aaatatcagt gcacatggca 41580
agtgtgcacg agcaatagct tgcccttacg ttcattatit agcatgtact actactaact 41640
acgcaaaaat caattcaccg attattaaac tgtaacatc attttagcac gtaacatat 41700
gtttcattca acacaccggt tttggcacat ttacaaactt gcaaagttgc aatactccct 41760
tcgttacata gcataagaga ttttaggtga atgtgacaca tctatccaaa ttcattatac 41820
tagaatgtat caccgcctcc acgccgggag ggagagcgcc gccggtggag aaagggggag 41880
ggagtgggtcg aggggaacca gtaggggtcc ctccccgtcg ccgcctcccc gtggccgcgc 41940
cggcgagaca ggaggaagag ggggatatgg agcggcgccg ccggtgaggg cgcgcgcgcg 42000
ggggggagcg gcgacgccgg tgaggaaggg aaggggagtg gtggctttga gagagatagg 42060
ggggaggaaa aatgatttta gagttagggt ttgggtgtgt gagtttttat atagatcggg 42120
atcaatcagg accgtccatc agatcggaca actacggctt ctcccgctt gggccgggtg 42180
ccactcctag gttgcccaca ctattgggcc acatgtacgc tccgcgtgaa ataagttcac 42240
tttaggtcct ttaagttgcc tctgaattgt tcccaggccg gccgcactat tgggccaccc 42300
cataggccat gtgtacgctc cgcacagaat aatttcgctt tagctccctt aatttgtccc 42360
ctcaaaactcc taaaaccagt gcaaatcttt aatttttagt tcacccattg caactcacgg 42420
gcatatttgc tagtgacata taatatgaaa cgaaggatgt agcagactat agaatttaaa 42480

ctgtgctttc attttagagc atcactaact gttattttaga tttttattta aataaatgct 42540
gaaatgatgt ttttattatg aaaatttagca ataaagctcc caaaatttca aaaaaaaatt 42600
aaaagagatt tattaatcat ggtaatttta attaaaaatt aaatctaacc atatcatatt 42660
atttcacggt ccgtgatgag gaaatggcag ctgctatcac ttacgggtggg agagaagggg 42720
cattgtttat ttttataact atctcttata actcccatga aactataaaa taaatataat 42780
cattatcata acattagttt tttttccatt gcaacgcaag ggtaattttt cagtacaata 42840
aaaaaaataa aagtgggcca ttctgaacgg aaatttctgg ttttttttcc caagagcgcc 42900
gcacacaact gcgcaagaga tcgatcgcca tcaccctgct cgtcgccgat ctctacacc 42960
atccctgccca tctccttccc ctccactggc tgctgctgca cctgtcagct agggcgggca 43020
tggcgcgcgg cgccgcttcc cgcgctgctg gcgcccttcg ctcgaggggc tcgatccaag 43080
ggcgaggggg ccgcgcgggg ggcagtggcg gtggcgcgga ggacgcacgc cacgtgttcg 43140
acgaattgct ccgtcgtggc ataccagatg tcttctccta caatattctt ctcaacgggc 43200
tgtgtgatga gaacagaagc caagaagctc tcgagttact gcacataatg gctgatgatg 43260
gaggtgactg cccacctgat gtggtgtcgt acagcacctg catcaatggc ttcttcaagg 43320
agggggatct ggacaaaatg cttgaccaga ggatttcgcc aaatgttggtg acctacaact 43380
ctattattgc tgcgctatgc aaggctcaaa ctgtggacaa ggccatggag gtacttacca 43440
ccatggttaa gagtgggtgc atgcctgatt gcatgacata taatagtatt gtgcatgggt 43500
tttgctcttc agggcagccg aaagaggcta ttgtatttct caaaaagatg cgcagtgatg 43560
gtgtcgaacc agatgttggt acttataact cgctcatgga ttatctttgc aagaacggaa 43620
gatgcacgga agcaagaaag atttttgatt ctatgaccaa gaggggccta aagcctgata 43680
ttactaccta tggtagcctg cttcaggggt atgctaccaa aggagccctt gttgagatgc 43740
atggtctctt ggatttgatg gtacgaaacg gtatccaccc taatcattat gttttcagca 43800
ttctagtatg tgcatacgct aaacaagaga aagtagaaga ggcaatgctt gtattcagca 43860
aatgaggca gcaaggattg aatccgaatg cagtgcaccta tggaacagtt atagatgtac 43920
tttgcaagtc aggtagagta gaagatgcta tgctttattt tgagcagatg atcgatgaag 43980
gactaagacc tgacagcatt gtttataact ccctaattca tagtctctgt atctttgaca 44040
aatgggagaa ggctgaagag ttatttcttg aaatgttgga tcgaggcatc tgtcttagca 44100
ctattttctt taattcaata attgacagtc attgcaaaga agggagggtt atagaatctg 44160
gaaaactctt tgacttgatg gtacgaattg gtgtgaagcc cgatatcatt acccttggca 44220

ggtaagatgg atgaagcaat gaagttactt tctggcatgg tctcagttgg gttgaaacct 44280
aatactgtta cttatagcac ttgattaat ggctactgca aaattagtag gatggaagac 44340
gcgtaggttc tttttaagga gatggagagc agtgggtgta gtcctgatat tattacgtat 44400
aacataattc tgcaagggtt atttcaaacc agaagaactg ctgctgcaaa agaactctat 44460
gtcaggatta ccgaaagtgg aatgcagatt gaactttgtt agatttaatt ggataattaa 44520
tccatttaaa tcaattaaat caaataaatt ccaaggctca ttatgctagg aattcatgtg 44580
aattcattct tctatgggat atcaatggga tgaagagttt tgagaattaa tccatttgat 44640
taaggaattg gtaacttata tcaattaatc ctaattgatg gatggttgat ggttggttag 44700
tggaggatgg ttcatggcta gttgatgaca attagtgtgt ctattcctct tcctattcca 44760
ttggtaactt acatcaaita ctcttaattg attgttggtt gatggttggt tagtggagga 44820
tggttcatgg ctagttgatg acaattagtt gctccattcc tcttcctatt ccatgactct 44880
tactcttcat ctccattcc tcttataaaa tgagaatgga ttgatctcc cgcgagaaga 44940
agaagacaca ctttcatcca ttttcaaag ctgttgctgc tacggtaatc ccatcccgac 45000
gagtgtgtgc acacgcgttg ggagagtagg cctccgaaac cacgcgttgc tgcgacgtt 45060
gcacagacgg gcgggcgatc aggtttttgg ggagcgcaag gcgcgactac tcaactgttcg 45120
tcaacatcta cttcatcttc accaacaatgt cgaacactgg agacaaggag aaggagactc 45180
ccgtcaacac caacggaggc aatactgcct caaactccag cggaggacca ttcttggggt 45240
ataacettat tacattatit caattagaag ttttactgtt aatgttcac gcaatgtcaa 45300
cattgtgtca ttatgtgatt gttgatgctt attcaacgtt aagcatgctc atgttgatta 45360
cattcaccac tatcactgga tcaaataccta ttgtaaatat catgtttatt atcttgttat 45420
tttgattaa aatatgccga attatgacca aatttccaac aaacttagca catacaacat 45480
aatccttcat ggactttgca aaaacaaact cactgatgat gcacttcgaa tgtttcagaa 45540
cctatgtttg atggatttga agcttgaggc taggactttc aacattatga ttgatgcatt 45600
gcttaaagtt ggcagaaatg atgaagccaa ggatttggtt gttgctttct cgtctaacgg 45660
tttagtgccg aattattgga cgtacagatt gatggctgaa aatattatag gacaggggtt 45720
gctagaagaa ttgatcaac tctttctttc aatggaggac aatggctgta ctgttgactc 45780
tggcatgcta aatttcattg ttagggaact gttgcagaga ggtgagataa ccagggttg 45840
cacttacctt tccatgattg atgagaagca cttttccctc gaagcatcca ctgcttccct 45900
gtttatagat cttttgtctg ggggaaaata tcaagaatat catatatttc tccctgaaaa 45960

atacaagtcc tttatagaat ctttgagctg ctgaagcatt ttgcagcttt gaaattctgt 46020
gttgaattc ttttctcta cagtccgatt agaggagga tcttctctgt atgtgtaa 46080
agcgaggtat gtatgtcacc tctccgaatt attttgactg tggttcctgg actgtaaaca 46140
agctattatc ttctgggtgt gatgccagaa aaaacacaaa agtttgctgt tatctctact 46200
aacggatcat aaaggggttt gtaactggag tttcaaaactt aaggatatcta ggcagtaggt 46260
atatattgat cctacatctt atgatcttaa gatgatatcc ttctcattat cctctgctga 46320
aactttagct tgaaccgtca tctacaccac aatttgagcc ccttagcaca gagcacaacg 46380
agcaatagct tgcccttacg ttcatattt agcatgcact actactaact acccaataat 46440
caatacatcg gttattaaac tgttgtaca gtttaataat gtcattttat cacgtaaca 46500
tatgtttcat tcaacaccac accggtttg gcacagtgc aaacttgcaa taacattttt 46560
actacttctc cgccccataa tataacaatc tcgttcata ctatattgct atattacggg 46620
acggatgaag tacttctttc ctccaaaat ataagaatct agtcctagat tagatattat 46680
ttggattcac gaatttgatt aggctatcta gattttagt cgtagtaat gtctaattcg 46740
gtaatagggt attacctctt tggatggagg gagtagttt tatttcgtac tccctctgtt 46800
tcatattata agttgttttg acttttttct tagtcaaatt ttattgagtt tgactaaatt 46860
tatagaaaaa aaattagcaa catttaagca ccacattagt ttcatataat gtagcatgga 46920
atatattttt ataatatgtt tgttttttta ttaaaatgct actataattt tctataaatg 46980
tagccaaatt taaagaagtt tgattacgaa aaaaaatcaa aatgacatat aatatgaaac 47040
tgaggatgta gcagactata gcaaatttaa actatgcttt tatttttagag catcaccaa 47100
agagatagcc taaatcttat cttaactaat taaaatattc ataattttcc tttcgtcaca 47160
ttaaattttc gtccgtaa at ccgattgaaa tccaactaga caatccaaaa aatagagaaa 47220
aagaacagaa aaaataataa aaagcacaca aatcttatct caatcccgcg ggaagctgcc 47280
gatgccgccg aatccgctcg agcgccgccg ccgccgtca cggggaacga tgcgctgct 47340
atcgcacgtg gtatgggagg gcgcccgcgc cgctgcttgg gagataggat atggagagag 47400
aaggaaatgt gagggagggt taggtttttc ccattcgtat tcttcagcga cacggaggcg 47460
atccaagctg tccatcagat cagacggctc agaacgcctc catcttcagg ccgcgcatgc 47520
ttgatgggcc gagggaaggc cggagggtcg acaaacgta gtcagaggag gagttggagg 47580
aggtaaagta gaatttat t gcgggctgag atagtaa at gactgaaaat ggcccataga 47640
gaaattggga attttattta aataaatgtt gaaaagggtt ttatattatc aaaattagaa 47700

attaagctcc gaaaatttta aaaaatattc aaagagcatt attaatcatg attaatttaa 47760
taaaaattaa atccaacat atcatattat ttcacggcgc gcagtaggaa aatgcgcagc 47820
tgttgtcgct tacgggtgga gagaaggac attgtttatt ttcagaacta tcttttataa 47880
ctcccatgga actttaaaat aaatataatc attattatag cattagtttt tttctgtctt 47940
ttttttcccc aagagcgccg cgcagaagag atcgatecgc atctccctgc cccgacgtcg 48000
ccggccgatc tctcattctc tccacgccct gctcgtcgcc gatctcctac accatccctg 48060
ccatctcctc ctteccctcc cctctatcct ccactggtgc cgcccacctc tccgtataag 48120
acaaactgcg ttgcggcggtt ggtttcgcc ggcgctgctg ctgcacctgt cagctagggc 48180
gggcatggcg cgccgcgcgc cttcccgccg tgttggcgcc cttcgctcgg acggctcgat 48240
ccaagggcga ggaggccgcg cggggggcag tggcgccgag gacgcacgcc acgtgttcga 48300
cgaattgctc cggcgtggca ggggcgcctc gatctacggc ttgaaccgcg ccctcgccga 48360
cgtcgcgcgt cacagccccg cggccgccgt gtcccgtac aaccgcatgg cccgagctgg 48420
cgccgacgag gtaactcccg acttgtgcac ctacggcatt ctcatcggtt gctgctgccg 48480
cgccggccgc ttggacctcg gtttcgcggc cttgggcaat gtcattaaga agggatttag 48540
agtggaagcc atcaccttca ctctctgct caagggcctc tgtgccgaca agaggacgag 48600
cgacgcaatg gacatagtgc tccgcagaat gaccgagctc ggttgcatac caaatgtctt 48660
ctctacaat aatcttctca acgggctgtg tgatgagaac agaagccaag aagctctcga 48720
gttgctgcac atgatggctg atgatcgagg aggaggtagc ccacctgatg tgggtgcgta 48780
taccactgtc atcaatggct tcttcaaaga gggggattca gacaaagctt acagtacata 48840
ccatgaaatg ctggaccggg ggattttacc tgatgttgtg acctacagct ctattattgc 48900
tgcgttatgc aagggtcaag ctatggacaa gccatggagg tacttaccac gatggttaag 48960
aatgggtgtca tgcctgattg catgacatat aatagttatt tcttgaaatg ttggatcgag 49020
gcatttgtct ggacactatt ttctttaatt caataattga cagtcattgc aaagaaggga 49080
gggttataga atctgaaaaa ctctttgacc tgatggtacg tattggtgtg aagcctgata 49140
tcattacata cagtacactc atcgategat attgcttggc aggtaagatg gatgaagcaa 49200
tgaagttact ttctggcatg gtctcagttg gggtgaaacc taatactgtt acttatagca 49260
ctttgattaa tggctactgc aaaattagta ggatggaaga cgcgttagtt ctttttaagg 49320
agatggagag cagtgggtgt agtcctgata ttattacgta taacataatt ctgcaagggt 49380
tatttcaaac cagaagaact gctgctgcaa aagaactcta tgtcaggatt accgaaagt 49440

gaacgcagat tgaacttagc acatacaaca taatccttca tggactttgc aaaaacaaac 49500
tcaactgatga tgcacttcag atgtttcaga acctatgttt gatggatttg aagcttgagg 49560
ctaggacttt caacattatg attgatgcat tgcttaaagt tggcagaaat gatgaagcca 49620
aggatttggt tgttgctttc tcgtctaacg gtttagtgcc gaattattgg acgtacaggt 49680
tgatggctga aaatattata ggacaggggt tgctagaaga attggatcaa ctctttcttt 49740
caatggagga caatggctgt actgttgact ctggcatgct aaatttcatt gttagggaac 49800
tgttgcagag aggtgagata accagggctg gcacttacct ttccatgatt gatgagaagc 49860
acttttcct cgaagcatcc actgcttcct tgtttataga tctttgtct gggggaaaat 49920
atcaagaata ttataggttt ctccctgaaa aatacaagtc ctttatagaa tctttgagct 49980
gctgaagcat tttgcagctt tgaattctg tgttggaatt cttttctcct acagtcctat 50040
tagaggaggg atcttctctg tatgtgtaa tagcgaggta tgtatgccac ctctccgaat 50100
tatttttact gtggttccta gactgtaaac aagcaattat gttatgctgt tgatgccaga 50160
aaaaacataa aagtttgctg ttatctctac taacggatca taaagggatt tgtgactgga 50220
gtttcaaact taatgtgtct aggcagtaat tttgacatta gatccaaaac aatttatagg 50280
gtttcattaa atttcatcta tgtgtactgt ttaggtgttg aatagtttg cttgtttttt 50340
aactgaacaa aagatatgtc tgaagcttg ttctttacca aatgcagtac tgatcatcac 50400
aatatatatt ttatggaaca agattggatt gtatagaatg gtttccgatc tgattatctt 50460
atctcaacgt attattatgc acatgtacta atcatgaaat atctgatgga atgatgtttc 50520
tatttacctg tgtgaggcag caaggagtga gatggataac accacatact ccctctatcc 50580
cagaatataa gaagtttttag agttggacac gattattaag aaagtaggta gaagttagta 50640
gtggagggtt gtgattgcat gagtagtgga ggtagggtggg aaaagtgaat ggtggagggt 50700
tgtgatttgt tgggaagaga atgttggtag agaagttgtt atattttggg gagtacatta 50760
ttattctaga acaatactgt tgtgctcaag aagcgttcca aagatgtttc acaacctgtg 50820
ctcgatgggt tttgagctta atcctgggac attcagtatc atgatctgtc tcattcttaa 50880
acatggaata aaggatgaca gcatgatttc tttgtctcta taatcttttg gctaccacaa 50940
gataatagct gtaaactctat actactttaa aaggagtagt ggtggtggtg agtggtgaat 51000
ctgccaccac cccaccacca actctcaaaa ttctgacatg tgggatcact gtcaatccct 51060
tctccaagac atgtgggatc actgtcaatc ccttctccaa accaattgta tgatagaaca 51120
gtggaaatca cggacagacc atggagctct caaccataat catccttgcg agttaataac 51180

aaatggagcg taaacttggc aagcaaaaaa ctcaaattaa ttctaaaatt aagctctagg 51240
attcaaaaata gatttcctct ctgcattgtg ctgttatgat ttttaattcc gtaacaacgc 51300
aaatgcattt tgctagtctt ataaagaagg gttaatgcaa atattctgat taaatgattg 51360
tatctatgaa gtttgaatgc tagtggaagc tcctttgacc atgttttggt gtgcgagcat 51420
ttaagagagt gaagagaatg cttctttggt gctgttctgg tatggaagga tccacagata 51480
aaattcaggt tctactgctt ctctgcttgt aattttcatg aagctgcagt gaataccttg 51540
ttgaccactt gatctgttgc tttgaaggag aatatagtag tggccaaggt tggtgacggt 51600
gatggtggca tgtgatcccc cagatcttca gtgaccacaga gaggagggga cggcgcgtgg 51660
tgagctacaa ggcatactca gtggagggca agatcaaggc ctcccgtccg taggggactc 51720
cgctgcatca aggccaactg ctccgaactg atcaatttct ggtacggatc acttctcctt 51780
tccttttttt tttcacctta agcactctct tgattcttgc ctgctacctc ccttaatttc 51840
tttcaatata ttgtggcact tgatcatggc ggagaccac cttccagtgt gaatggattt 51900
tgtcaaagaa ctaaaattat tccattagct tattttctga ttacatggaa gacattcttt 51960
tctggaataa atacagaact aaatcctggt tcctgaataa aagttgttag tgtgtggcat 52020
ggtgcatttc cgcgcttcta aattttataa aacctgttca ttcaatttga acctgcatcc 52080
aatccaatat tttagggtgca gacaggtgct tgcggtcagg ttaaagaagt tggcaaaaat 52140
gcttctgaag aaagggtaat tgttgtttca tctcaggagg taatatgcag atgattattc 52200
caattggcat tgccttgcca tttttatcac gagtctttac aattttatat cctcctacat 52260
attctttcca gattccagat gatccagtgt ctccaacaat tgaggcgctt attttgctcc 52320
atagtaaagc aagtacactt gctgagaacc accagttgac aacacggctt gttgtaccat 52380
caaacaaagt tggttgtatt cttggggaag gtggaaaggt aattactgaa atgagaagac 52440
ggactggggc tgaatccga gtctactcaa aagcagataa acctaagtac ctgtcttttg 52500
atgaggagct tgtgcaggta atttatttgg ccatacctac accagagatc catatattac 52560
ttttataact gcagttttta cttgttaaca tttcattgtg cttttacatt tgttccaagc 52620
tttcaggttg ctgggcttcc agctattgaa agaggagccc tgacagagat tgcttcgagg 52680
ctttgaacta ggacactcag agatggaagt tcttccaata atccgacacc ttttgccctt 52740
gttgatggtc ctctgttga tatcttgctt aacaaggaat tcatgctata tggacgatct 52800
gctaatagtc ccccatatgg agggcctgct aatgatccac catatggaag acctgccatt 52860
gatccacat atggaagacc aatatccaca atatggaaga cctgccaatg atccaccata 52920

tagaagacct gtcaatgata catcatattg aggggttgac aatgatgggc ctcgtgatca 52980
 ggccccgtcc tgaggggggt cgaatggggc gatcgctccg ggccccgat tcccagggcc 53040
 cccacctatc tgtgcaacga gtagtagcga tcttccagcg cgcaacgtga ggcgatgttt 53100
 ctccgtgatt tcgccggcct gcaactgcga gatcgcgagt ataacgatca gccgatcgat 53160
 ctcatctgcc gactgccatg ctgatgccac acgcaagcgc agcatatcag ccttatcttg 53220
 gttgatcggc atgctggacg agcacatctg ttgtcgcac aactgctgac tgctatatat 53280
 gtgctggtgc tgaatcgatc gattgtcgtc gcggaagtga agaacaacca cggcactgct 53340
 gcctgctggg ctctagccgc catcagtaag tacgctatac tgcctatcta gatctagatc 53400
 gagattacat agtgggaatta tctgtttata acaaaattac aaggtatcaa ttgataattt 53460
 aaggttataa ccgtacaaac ttcagtgttt tgctggtttc acattgggta gatttgtttc 53520
 aactaatttg gtacttctgt agccttgtaa tttacgaatc tagtattaat attttcttaa 53580
 gtattagcct gttccttgat attatgctgt tgagaaagta tgcaatagat aacaaaaaca 53640
 agtaggtgtg ttgaggatgc tcaagagtaa tacagccact tcaataattc tgatattatc 53700
 aggacatcat caataattct gcgcctacaa atcttcaaag aaaattttaa tataatgcgt 53760
 atgatttttt aaatacgaat attgattgct atttaaagat atttatatta tatggtaatt 53820
 attatttgaa ggtttataat aaaggcctcc gtttttagtt tcacgctggg ccttcagaat 53880
 ctcaggaccg gccctgctca tgatc 53905

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 29

atcaggagcc ttcaaattgg gaac 24

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 30

ctcgcaaatt gcttaatttt gacc 24

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 31

tgaaggagtt atgggtgcgt gacg 24

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 32

ttgccgagca cacttgccat gtgc 24

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 33

gcgacgcaat ggacatagtg ctcc 24

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 34

ttacctgcca agcaatatcc atcg 24

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 35

aaggcatact cagtggaggg caag 24

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 36

ttaacctgac cgcaagcacc tgtc 24

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 37

tggatggact atgtggggtc agtc 24

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 38

agtggaagtg gagagagtag ggag 24

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 39

ccctccaaca cataaatggt tgag 24

<210> 40
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for amplification
<400> 40
tttctgccag gaaactgtta gatg 24

<210> 41
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for amplification
<400> 41
gcgatcttat acgcatacta tgcg 24

<210> 42
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for amplification
<400> 42
aaagtctttg ttccttcacc aagg 24

<210> 43

<211> 26
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for amplification
<400> 43
gaggatttat caaaacagga tggacg 26

<210> 44
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for amplification
<400> 44
tgggcggcag cagtggagga taga 24

<210> 45
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for amplification
<400> 45
aagaagggag gggtatagaa tctg 24

<210> 46
<211> 24
<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 46

atatcaggac taacaccact gctc 24

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 47

acgagtagta gcgatcttcc agcg 24

<210> 48

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 48

cagcgtgaaa ctaaaaacgg aggc 24

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 49

atccacatc atcataatcc gacc 24

<210> 50

<211> 25

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 50

agcttctccc ttggatacgg tggcg 25

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 51

atttggtggt tagttgcggc tgag 24

<210> 52

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 52

gcccaaactc aaaaggagag aacc 24

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 53

cctcaagtct cccctaaagc cact 24

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 54

gctctactgc tgataaaccg tgag 24

<210> 55

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 55

tg gatggact atgtggggtc agtc 24

<210> 56
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for amplification
<400> 56
agtggaagtg gagagagtag ggag 24

<210> 57
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for amplification
<400> 57
tacgacgcca tttcactcca ttgc 24

<210> 58
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for amplification
<400> 58
catttctcta tgggcgttgc tctg 24

<210> 59
<211> 26

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 59

acctgtaggt atggcacctt caacac 26

<210> 60

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 60

ccaaggaacg aagttcaaat gtatgg 26

<210> 61

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 61

tgatgtgttt gggcatccct ttcg 24

<210> 62

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 62

gagatagggg acgacagaca cgac 24

<210> 63

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 63

tcctatggct gtttagaaac tgcaca 26

<210> 64

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 64

caagttcaaa cataactggc gttg 24

<210> 65

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 65

cactgtcctg taagtgtgct gtgc 24

<210> 66

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 66

caagcgtgtg ataaaatgtg acgc 24

<210> 67

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 67

tgccactgc cattactatg tgac 24

<210> 68

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 68

acatactacc gtaaattggtc tctg 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09429

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/29, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/29, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | Yoshimichi FUKUDA et al., "RFLP Marker o Mochiita Ine no Nensei Kaifuku Idenshi (Rf-1) ni Kansuru Rensa Bunseki", Breeding Science, 1992, Vol.42, supl.1, pages 164 to 165 | 1-18 |
| A | JP 9-313187 A (Mitsui Toatsu Chemicals, Inc.), 09 December, 1997 (09.12.97), (Family: none) | 1-18 |
| A | JP 2000-139465 A (Mitsui Chemicals, Ltd.), 23 May, 2000 (23.05.00), (Family: none) | 1-18 |
| P, A | JP 2002-345485 A (Japan Tobacco Inc.), 03 December, 2002 (03.12.02), (Family: none) | 1-18 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 21 November, 2002 (21.11.02)

Date of mailing of the international search report
 10 December, 2002 (10.12.02)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl¹ C12N15/29, C12Q1/68

B. 調査を行った分野
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl¹ C12N15/29, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
Genbank/EMBL/DBJ/GenSeq, WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| A | 福田 善通 等, RFLPマーカーを用いたイネの稈性回復遺伝子(Rf-1)に関する連鎖分析, 育種学雑誌, 1992, Vol. 42, suppl. 1, p. 164-165 | 1-18 |
| A | JP 9-313187 A (三井東圧化学株式会社) 1997. 12. 09 (ファミリーなし) | 1-18 |
| A | JP 2000-139465 A (三井化学株式会社) 2000. 05. 23 (ファミリーなし) | 1-18 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
21. 11. 02

国際調査報告の発送日

10.12.02

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
新見 浩一

4B 9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| PA | JP 2002-345485 A (日本たばこ産業株式会社) 2002.12.03 (ファミリーなし) | 1 - 1 8 |